

Patent number: DE10118463
Publication date: 2002-10-10
Inventor: WOLLESCHEFSKY RALF (DE); KEMPE MICHAEL (DE)
Applicant: ZEISS CARL JENA GMBH (DE)
Classification:
- **international:** G02B21/00; G02B26/10
- **european:** G02B21/00M4
Application number: DE20011018463 20010407
Priority number(s): DE20011018463 20010407

Abstract of DE10118463

Sample is scanned with light of at least one wavelength with detection of the light based on reflection, fluorescence, luminescence, transmission or scattering of the incident light. The illuminating light is modulated in at least one spatial direction. The scanning motion and the detection is achieved using two different phase modulation angles or modulation frequencies, so that a resultant section can be calculated through the sample. Independent claims are also included for: (1) An arrangement for depth-resolved optical imaging of a sample; (2) A method for parallel excitation of a sample interaction.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

0072-0000

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 18 463 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/00
G 02 B 26/10

②① Aktenzeichen: 101 18 463.8
②② Anmeldetag: 7. 4. 2001
④③ Offenlegungstag: 10. 10. 2002

⑦① Anmelder:
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

⑦② Erfinder:
Wolleschensky, Ralf, Dipl.-Ing., 99510 Apolda, DE;
Kempe, Michael, Dr., 07749 Jena, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 199 30 816 A1
CH 6 77 972 A5

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren und Anordnung zur tiefenaufgelösten optischen Erfassung einer Probe

⑤⑦ Verfahren zur tiefenaufgelösten optischen Erfassung einer Probe, mit einer scannenden Bewegung von einer auf oder in einer Probe erzeugten Beleuchtungslichtverteilung mindestens einer Wellenlänge über die Probe (zumindest einen Teil der Probe) und Detektion insbesondere des aufgrund von Wechselwirkung mit der Probe beeinflussten Lichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes und/oder reflektierten Lichtes und/oder Lumineszenzlichtes und/oder gestreuten und/oder transmittierten Lichtes, wobei das Beleuchtungslicht eine Modulation in zumindest einer Raumrichtung aufweist und die scannende Bewegung und zur Scanbewegung zugeordnete Detektion zumindest bei einer ersten und einer zweiten unterschiedlichen Phasenlage der Modulation und/oder ersten oder zweiten Frequenz der Periodizität der Modulation erfolgt und mindestens ein optisches Schnittbild durch die Probe/den Probenteil berechnet wird.

DE 101 18 463 A 1

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung in der Mikroskopie, insbesondere der Fluoreszenz Laser Scanning Mikroskopie zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierenden Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Screening) sowie auf anderen Kontrastmechanismen basierende Methoden der Laser Scanning Mikroskopie.

Stand der Technik

[0002] Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, "Handbook of Biological Confocal Microscopy"; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

[0003] Die eingestrahnten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur Anregungsstrahlung generell rot verschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

[0004] Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden wiederum spezielle dichroitische Strahlteiler verwendet.

[0005] Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hochenergetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr der des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems"; Academic Press 1996). Abb. 1b zeigt eine Anregung mittels der simultanen Absorption von 2 Photonen im nahen infraroten Wellenlängenbereich. Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflusst, d. h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Vergleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

[0006] Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

[0007] Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle L, Scanmodul S, Detektionseinheit DE und Mikroskop M. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE 197 02 753 A1, US 6167173 verwiesen.

[0008] Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul L erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser A-D (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul L die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z. B. durch den Einsatz eines akusto-optischen Modulators. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul S. Die in der Lichtquelle L erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs (2) beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scan Lens und die Tubuslinse in das Präparat (Probe 3) fokussiert. Der Fokus wird rasterförmig in x-y-Richtung über die Probe 3 bewegt. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe 3 liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

[0009] Bei einer konfokalen Detektion (descannte Detektion) des Fluoreszenzlichtes gelangt das Licht, das aus der Fokusebene (Probe 3) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht über dichroitische Strahlteiler DBS 1-3 und Pinholeoptiken auf eine Blende (konfokale Blende/Pinhole) (PH 1, 2, 3, 4) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene des Objektivs 2 konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF1-4) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT1-4) gemessen.

[0010] Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen in dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion über T-PMT, PMT 5 kann in Detektionsrichtung direkt nach dem Objektiv oder auf der dem Objektiv abgewandten Seite erfolgen (non descannte Detektion).

[0011] In einer weiteren Anordnung zur Detektion (nicht dargestellt) einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descannte Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs von der Pinholeoptik PH in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descannte Detektion).

[0012] Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch die geschilderten Detektionsanordnungen in Ver-

bindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wieder gegeben, die mit der Fokusebene des Objektivs zusammenfällt. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

[0013] Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

[0014] Statt eines Punktscanners werden nach dem Stand der Technik auch so genannte Linienscanner verwendet (Lit.: Corle, Kino; "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems"; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in die Probe (3) abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung (x oder y) gescannt. Die Erzeugung des Linienfokus erfolgt mit Hilfe mindestens einer in Abb. 2 gestrichelt dargestellten Zylinderlinse (ZL) im kollimierten Beleuchtungsstrahlengang in deren Brennweite sich eine Pupillenebene der Mikroskopanordnung befindet. Als konfokale Blende (PH) dient in einem solchen Aufbau eine Schlitzblende anstatt der Pinholes PH 1-4. Eine nichtdescannte Detektion bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung erfolgen. Hierzu kann wiederum die konfokale Blende (PH) entfallen. Zur Detektion wird eine CCD-Kamera (nicht descant) oder Zeile (descant) mit 1024 oder mehr Bildpunkten anstatt des Punktdetektors (PMT) eingesetzt. Durch das Scannen einer Linie anstatt eines Punktes kann die Bildaufnahmerate erheblich vergrößert werden. Somit kann dieses Scanverfahren zur Beobachtung von schnell ablaufenden Prozessen in Echtzeit (Echtzeitmikroskopie) verwendet werden.

[0015] Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass die Tiefenauflösung durch die Schlitzblende um einen Faktor 1,4 schlechter ist im Vergleich zu punktscannenden Laser Scanning Mikroskopen. Dies kommt daher, dass die konfokale Schlitzblende nur Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des konfokalen Schnittes senkrecht zur Scanlinie unterdrückt. Zusätzlich verschlechtert sich die laterale Auflösung.

[0016] In einer weiteren Anordnung zur Echtzeitmikroskopie nach dem Stand der Technik wird das komplette zu untersuchende Feld mittels einer aufgeweiteten Lichtquelle beleuchtet. Jedoch werden nur spezielle Punktmuster des gesamten zu scannenden Feldes durch eine sich schnell drehende Scheibe freigegeben. Diese Verfahren werden in der Literatur meist als Nipkow-Disk Verfahren bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems"; Academic Press 1996).

[0017] In einem weiteren Verfahren nach dem Stand der Technik, der sogenannten strukturierten Beleuchtung (siehe Abb. 3), nutzt man die Modulationstiefe der optischen Abbildung einer Amplitudenstruktur (z. B. Gitter) als Kriterium für die Tiefenschärfe. Das Bild der periodischen Struktur zeichnet sich durch die Frequenz der Modulation und die Phasestellung (Bildphase) der Modulation aus.

[0018] Durch eine Phasenverschiebung der Struktur senkrecht zur optischen Achse können unterschiedliche Projektionsszenarien erhalten werden.

[0019] Um streifenfreie, tiefendiskriminierte optische Schnitte berechnen zu können, werden im allgemeinen mindestens 3 Phasenbilder PB bei 0°, 120° und 240° benötigt. Diese Phasenbilder (PB) werden anschließend zu einem (konfokalen) optischen Schnittbild in einem Image Prozessor mit folgender Formel verrechnet:

$$I_{\text{Section}}(x) = \text{Const} \cdot \sqrt{(I(x, 0^\circ) - I(x, 120^\circ))^2 + (I(x, 120^\circ) - I(x, 240^\circ))^2 + (I(x, 0^\circ) - I(x, 240^\circ))^2},$$

wobei I(x, Winkel) die Intensität am jeweiligen Pixel in dem entsprechenden Phasenbild beschreibt.

[0020] Die Aufzeichnung der 3 oder mehr Phasenbilder erfolgt im einfachsten Falle sequentiell. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Probe während der Messung der Bilder nicht bewegt. Die so aus den Phasenbildern berechneten Schnittbilder bzw. Schnittstapel können anschließend mittels 3-D Auswertesoftware auf einem Standard PC und Monitor dargestellt werden. Die Ortsauflösung entlang der optischen Achse hängt von der Wellenlänge des Lichtes, der numerischen Apertur des Objektivs und der Modulationsfrequenz ab.

[0021] Für eine detaillierte Beschreibung des Berechnungsalgorithmus wird auf T. Wilson et al.; "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope"; Optics Letters 22 (24) 1997 verwiesen.

[0022] Nachteilig bei bisherigen Verfahren zur Echtzeitmikroskopie ist weiterhin, dass bei einer simultanen Untersuchung von mehreren Farbstoffen auch mehrere Detektionseinrichtungen vorzusehen sind. Dadurch erhöhen sich die Anforderungen an die Datenübertragung und die Kosten für ein solches Gerät. Deshalb werden heutzutage nur Mikroskope zur sequentiellen Bildgebung der verschiedenen Farbstofffluoreszenzen eingesetzt. In DE 198 29 981 A1 wird ein Verfahren beschrieben, die Anregungswellenlänge und/oder Intensität während des Scanvorgangs zu ändern.

[0023] Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung einer neuen Methode mit der Präparate in Echtzeit und mit einer hohen optischen Auflösung abgebildet werden können.

[0024] Diese Aufgabe wird durch Anordnungen und Verfahren gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst.

[0025] Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

[0026] Die Erfindung ist zum Einsatz in Applikationen, die Mehrfachfluoreszenzen erfordern, besonders geeignet, da diese simultan und vorteilhaft auch mit vergleichbarer optischer Auflösung wie bei einem punktscannenden LSM, jedoch in Echtzeit aufgezeichnet werden können.

[0027] Die Methode kann in bildgebenden Mikroskopiern eingesetzt werden wie Laser Scanning Mikroskopen zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen, räumlichen Auflösung bis zu 200 nm und in analytischen Mikroskopiern wie beispielsweise Fluoreszenzkorrelationsspektrometern eingesetzt werden.

[0028] Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen wie z. B. in sogenannten Chipreadern eingeschlossen, die sich von den Verfahren der Laser Scanning Mikroskopie vor allem durch ein deutlich größeres Bildfeld unterscheiden.

[0029] Gegenstand des Verfahrens zur Erhöhung der räumlichen Detektionsauflösung, vorzugsweise bei einem in Echtzeit bildgebenden Verfahren, ist eine linienförmige Anregung und Detektion der von einer Probe reflektierten, gestreuten und/oder transmittierten Anregungsstrahlung und/oder angeregten Fluoreszenz. Hierzu wird mittels geeigneter und weiter unten näher beschriebener Optiken ein Linienfokus der Anregungsstrahlung in der Probe erzeugt. **Abb. 4** zeigt ein mögliches Meßablaufschemata. Auf der linken Seite ist ein Scanfeld mit dem Linienfokus dargestellt. Der Linienfokus kann mit geeigneten Hilfsmitteln (Scannerspiegel in einer Richtung) entlang des eingezeichneten Pfeiles verschoben werden. Die Erhöhung der axialen und lateralen optische Auflösung erfolgt durch eine Strukturierung des Linienfokus. Die Strukturierung erfolgt durch Überlagerung der Scanlinie mit einer periodischen Struktur, erzeugt beispielsweise durch ein Sinusgitter im Strahlengang. Bei einer kohärenten Beleuchtung kann eine Erzeugung der Struktur auch durch eine Interferenz von 2 kohärenten Teilstrahlen in der Probe erzeugt werden (Lit.: Wilson WO 98/45745). Es werden mindestens zwei Bilder mit unterschiedlicher Phasenlage der periodischen Struktur aufgenommen. Grundsätzlich kann der optische Schnitt auch durch die Aufnahme von Bildern mit unterschiedlicher Modulationsfrequenz der Struktur erfolgen.

[0030] Die Beleuchtung der Probe kann mit räumlich und zeitlich kohärenter oder inkohärenter Beleuchtung erfolgen. Es kann beispielsweise auch eine räumlich kohärente Laserlichtquelle durch die Verwendung einer Streuscheibe oder durch die Aneinanderreihung mehrerer Einzelfoki in der Probe für eine inkohärente Beleuchtung verwendet werden.

[0031] Es werden vorteilhaft mindestens 2 Phasenbilder PB mit Bildphasen von z. B. 0° und 180° bei Verwendung einer Anregungswellenlänge zur Berechnung eines optischen Schnittbildes im Image Prozessor benötigt.

[0032] Bei n Anregungswellenlängen sind n + 1 Phasenbilder nötig.

[0033] Für eine Anregungswellenlänge hat das von der Probe emittierte Signal entlang einer Scanlinie folgende Gestalt:

$$I_{\text{sig}}(x) = C(x) \cdot \cos(k \cdot x) + B(x)$$

wobei C(x) die eigentliche Objektinformation (z. B. die Konzentration und der Wirkungsquerschnitt des Farbstoffes oder der lokale Reflektionskoeffizient) an der Position x innerhalb des konfokalen optischen Schnittes und entlang des Linienfokus für die Anregungswellenlänge trägt und die gesuchte Größe darstellt. B(x) trägt die Objektinformation von außerhalb des konfokalen Bereichs. B(x) ist nicht moduliert, da die Struktur außerhalb des konfokalen Bereiches nicht scharf abgebildet wird. k ist die inverse Modulationsfrequenz der strukturierten Anregung. Die obige Gleichung besitzt 2 Unbekannte C(x) und B(x). Zur Bestimmung von C(x) ist die Aufnahme von 2 Phasenbildern nötig. Die Phasenbilder seien mit $I_i(x)$, $i = 0, 1, \dots, n$ bezeichnet und durch eine relative Phasenverschiebung der Modulation von $i \cdot \Delta\varphi$ (Bildphasen) charakterisiert, wobei sich folgendes Gleichungssystem ergibt.

$$I_0(x) = C(x) \cdot \cos(k \cdot x) + B(x)$$

$$I_1(x) = C(x) \cdot \cos(k \cdot x + \Delta\varphi) + B(x)$$

[0034] Die gesuchte Objektinformation ergibt sich durch Auflösen des Gleichungssystems nach C wie folgt:

$$C(x) = \frac{I_1(x) - I_0(x)}{\cos(k \cdot x + \Delta\varphi) - \cos(k \cdot x)}$$

[0035] Analog kann zur Bestimmung von C(x) auch die Aufnahme von 2 Bildern mit verschiedener Modulationsfrequenz k_0 und k_1 erfolgen. Die Frequenzbilder seien wieder mit $I_i(x)$, $i = 0, 1, \dots, n$ bezeichnet, wodurch sich folgendes Gleichungssystem ergibt.

$$I_0(x) = C(x) \cdot \cos(k_0 \cdot x) + B(x)$$

$$I_1(x) = C(x) \cdot \cos(k_1 \cdot x) + B(x)$$

[0036] Die gesuchte Objektinformation ergibt sich durch Auflösen des Gleichungssystems nach C wie folgt:

$$C(x) = \frac{I_1(x) - I_0(x)}{\cos(k_1 \cdot x) - \cos(k_0 \cdot x)}$$

[0037] C(x) kann auch durch Aufnahme mindestens zweier Bilder mit verschiedener Phase und Frequenz der Modulation gewonnen werden.

[0038] Aus diesen linienbezogenen Objektinformationen wird ein optischer Schnitt in mindestens einer Probenebene zusammengesetzt und kann wie im Stand der Technik zu mindestens einem Bild mindestens eines Bildstapels weiterverarbeitet werden.

[0039] Wenn nur eine Anregungswellenlänge benutzt wird und mindestens 3 Phasenbilder (z. B. mit relativer Phasenlage von 0°, 120° und 240°) aufgezeichnet werden, kann auch der beim Stand der Technik erläuterte Algorithmus zur Gewinnung der Objektinformation (Lit.: T. Wilson et al.; "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope"; Optics Letters 22 (24) 1997) bei allen hier beschriebenen Anordnungen zur Anwendung gelangen.

[0040] Bei einer simultanen Anregung mit mehreren Wellenlängen erfolgt die anschließende Trennung der Signale der

Probe durch eine spezielle Phasenkodierung oder Frequenzkodierung der Modulationsstruktur für die verschiedenen Anregungswellenlängen. Allgemein ergibt sich für n simultane Anregungswellenlängen die Anzahl der erforderlichen Phasenbilder zu $n + 1$. Dabei werden verschiedene Anregungswellenlängen durch eine definierte wellenlängenspezifische Lageverschiebung der Modulation (Kodierphase) und/oder eine jeweils charakteristische Modulationsfrequenz (Kodierfrequenz) voneinander getrennt. Das von der Probe emittierte Licht (z. B. Fluoreszenz), welches durch eine Wechselwirkung des Anregungslichts der jeweiligen Wellenlänge mit der Probe entsteht, besitzt dann die spezifische Kodierphase und/oder Kodierfrequenz in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und kann somit gemäß dem unten folgenden Algorithmus separiert werden.

[0041] Wird also z. B. eine Probe, wie in Abb. 5 dargestellt, mit verschiedenen Farbstoffen (1, 2, 3) im Scanfeld gefärbt, die unterschiedliche Wellenlängen (L_1, L_2, L_3) zur Anregung einer Fluoreszenz benötigen, so überträgt sich die Kodierfrequenz (f_1, f_2, f_3) und/oder die Kodierphasen (ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3) der Anregungsscanlinie auf die detektierte Fluoreszenz in der jeweiligen Region (1, ... n), siehe Abb. 6.

[0042] Im bevorzugten Fall besitzen alle Anregungswellenlängen die gleiche Kodierfrequenz, d. h. eine Modulationsfrequenz aber verschiedene Kodierphasen. Die folgende Diskussion sei auf diesen Fall mit Phasenkodierung beschränkt, wobei eine Kodierung mittels der Modulationsfrequenz analog zu behandeln und Gegenstand der Erfindung ist. Für zwei Anregungswellenlängen hat das von der Probe emittierte Signal entlang einer Scanlinie folgenden Gestalt:

$$I_{\text{sig}}(x) = C_1(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_1) + B_1(x) + C_2(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_2) + B_2(x)$$

wobei $C_1(x)$ bzw. $C_2(x)$ die gesuchte Objektinformation (z. B. Konzentration und Wirkungsquerschnitt des Farbstoffes) an der Position x innerhalb des konfokalen optischen Schnittes und entlang des Linienfokus für die beiden Anregungswellenlängen darstellen. $B_1(x)$ bzw. $B_2(x)$ trägt die Objektinformation von außerhalb des konfokalen Bereichs. $B_1(x)$ bzw. $B_2(x)$ sind nicht moduliert, da die Struktur außerhalb des konfokalen Bereiches nicht scharf abgebildet wird. ϕ_1 und ϕ_2 sind die den jeweiligen Anregungswellenlängen zugeordneten Kodierphasen und k ist die inverse Modulationsfrequenz (die in diesem Beispiel für beide Anregungswellenlängen gleich ist) der strukturierten Anregung. Die obige Gleichung besitzt 4 Unbekannte $C_1(x)$, $B_1(x)$, $C_2(x)$ und $B_2(x)$.

[0043] Zur Bestimmung von $C_1(x)$ und $C_2(x)$ ist die Aufnahme von 3 Phasenbildern nötig. Die Phasenbilder seien mit $I_i(x)$, $i = 0, 1, \dots, n$ bezeichnet und durch eine relative Phasenverschiebung der Modulation von $i \cdot \Delta\phi$ (Bildphasen) charakterisiert, wobei sich folgendes Gleichungssystem ergibt:

$$I_0(x) = C_1(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_1) + B_1(x) + C_2(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_2) + B_2(x)$$

$$I_1(x) = C_1(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_1 + \Delta\phi) + B_1(x) + C_2(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_2 + \Delta\phi) + B_2(x)$$

$$I_2(x) = C_1(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_1 + 2 \cdot \Delta\phi) + B_1(x) + C_2(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_2 + 2 \cdot \Delta\phi) + B_2(x)$$

[0044] Die gesuchte Objektinformation ergibt sich durch Auflösen des Gleichungssystems nach C_1 und C_2 wie folgt:

$$C_1(x) = [-c_{12}(x) \cdot (I_2(x) - I_0(x)) + c_{22}(x) \cdot (I_1(x) - I_0(x))]/\det(x)$$

$$C_2(x) = [c_{11}(x) \cdot (I_2(x) - I_0(x)) - c_{21}(x) \cdot (I_1(x) - I_0(x))]/\det(x)$$

$$\text{mit } c_{ij}(x) = \cos(k \cdot x + \phi_j + i \cdot \Delta\phi) - \cos(k \cdot x + \phi_i)$$

und $\det(x) = c_{11}(x) \cdot c_{22}(x) - c_{12}(x) \cdot c_{21}(x)$. Die Gewinnung der Objektinformation setzt somit die Kenntnis der Kodierphasen (ϕ_i) und der inversen Modulationsfrequenz (k) für die einzelnen Anregungswellenlängen voraus. Für die Lösung des Gleichungssystems und damit die Trennung der Objektinformationen, die durch die jeweilige Anregungswellenlänge sichtbar gemacht wurde, werden bei einer Zweifarbenanregung 3 Phasenbilder benötigt, wobei die Bildphasenverschiebung ($\Delta\phi$) zwischen den einzelnen Bildern im einfachsten Falle 120° beträgt.

[0045] Die Objektinformation von außerhalb des konfokalen Bereichs kann nur für die Summe der Beiträge aller anregenden Wellenlängen gewonnen werden. Im vorliegenden Beispiel ist dieser Hintergrund

$$B_1(x) + B_2(x) = I_0(x) - C_1(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_1) - C_2(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_2)$$

welcher bei Kenntnis von C_1 und C_2 berechnet werden kann.

[0046] Die Erweiterung auf 3 Anregungswellenlängen ergibt sich äquivalent aus der Lösung des entsprechenden Gleichungssystems, wobei $C_3(x)$ bzw. $B_3(x)$ die Objektinformation angeregt durch die dritte Wellenlänge von innerhalb bzw. außerhalb des konfokalen Schnittes, darstellen soll. Die Objektinformationen für die einzelnen Wellenlängen ergeben sich wie folgt:

$$C_1 = [(c_{12} \cdot c_{23} - c_{13} \cdot c_{22}) \cdot (I_3 - I_0) + (c_{13} \cdot c_{32} - c_{12} \cdot c_{33}) \cdot (I_2 - I_0) + (c_{22} \cdot c_{33} - c_{23} \cdot c_{32}) \cdot (I_1 - I_0)]/\det$$

$$C_2 = [(c_{13} \cdot c_{21} - c_{11} \cdot c_{23}) \cdot (I_3 - I_0) + (c_{11} \cdot c_{33} - c_{13} \cdot c_{31}) \cdot (I_2 - I_0) + (c_{23} \cdot c_{31} - c_{21} \cdot c_{33}) \cdot (I_1 - I_0)]/\det$$

$$C_3 = [(c_{11} \cdot c_{22} - c_{12} \cdot c_{21}) \cdot (I_3 - I_0) + (c_{12} \cdot c_{31} - c_{11} \cdot c_{32}) \cdot (I_2 - I_0) + (c_{21} \cdot c_{32} - c_{22} \cdot c_{31}) \cdot (I_1 - I_0)]/\det$$

mit $\phi_3(x)$ als Kodierphase der Modulation bei der dritten Anregungswellenlänge und

$$\det(x) = c_{11} \cdot (c_{22} \cdot c_{33} - c_{23} \cdot c_{32}) + c_{12} \cdot (c_{23} \cdot c_{31} - c_{21} \cdot c_{33}) + c_{13} \cdot (c_{21} \cdot c_{32} - c_{22} \cdot c_{31}).$$

- [0047] Bei einer 3 Farbenanregung ist die Aufnahme von 4 Phasenbildern zur Trennung der Objektinformation, angeregt durch die einzelnen Wellenlängen, notwendig. Die Bildphasenschrittweite kann beispielsweise 90 Grad betragen. Da die Größen c_{ij} für eine Anordnung mit vorgegebenen Kodierphasen und Kodierfrequenzen konstant sind, ist die Gewinnung der Objektinformation durch Signalverarbeitung eine einfache Operation. Diese Operation läßt sich durch Transformation der normierten Bildsignale $\Delta I_i(x) = I_i(x) - I_0(x)$ mittels als Konstanten abgelegter Faktoren $f_k(x)$, die sich aus den $c_{ij}(x)$ ergeben, angeben. Für 3 Wellenlängen ergibt sich z. B. aus den obigen Gleichungen:

$$C_1 = f_1 \cdot \Delta I_3 + f_2 \cdot \Delta I_2 + f_3 \cdot \Delta I_1$$

$$C_2 = f_4 \cdot \Delta I_3 + f_5 \cdot \Delta I_2 + f_6 \cdot \Delta I_1$$

$$C_3 = f_7 \cdot \Delta I_3 + f_8 \cdot \Delta I_2 + f_9 \cdot \Delta I_1$$

- [0048] In Verallgemeinerung ist es für die simultane Anregung mit n Wellenlängen erforderlich, $n + 1$ Bilder I_0 bis I_n mit jeweils eigener Phase und/oder Frequenz der Anregungsmodulation aufzunehmen. Bei Phasenbildern (Bildphase: ϕ_i) mit Phasenkodierung der Anregungswellenlänge (ϕ_j) ergeben sich folgende Bilder, die die mit der jeweiligen j -ten Wellenlänge angeregten Bildinformationen vom pseudokonfokalen Schnitt (C_j) und vom Hintergrund (B_j) enthalten.

$$I_0(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_0) + B_j(x)$$

$$I_1(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_1) + B_j(x)$$

$$I_2(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_2) + B_j(x)$$

$$\dots$$

$$I_n(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_n) + B_j(x)$$

[0049] Das sich daraus ergebende Gleichungssystem der Form:

$$\begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & \dots \\ c_{21} & c_{22} & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & c_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \dots \\ C_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_1 - I_0 \\ I_2 - I_0 \\ \dots \\ I_n - I_0 \end{pmatrix}$$

mit $c_{ij}(x) = \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_i) - \cos(k \cdot x + \phi_i)$ läßt sich mit bekannten mathematischen Methoden (z. B. laut Cramerscher Regel) nach den gesuchten Bildinformationen von innerhalb des pseudokonfokalen Schnitt, getrennt nach den einzelnen Anregungswellenlängen, auflösen.

[0050] Ferner läßt sich damit die von allen Wellenlängen angeregte Bildinformation von außerhalb des pseudokonfokalen Schnittes nach

$$\sum_{j=1}^n B_j(x) = I_0(x) - \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_0)$$

bestimmen.

[0051] Analoge Beziehungen gelten, wenn anstelle der Phase oder zusätzlich dazu die Frequenz zur Kodierung der verschiedenen Wellenlängen und/oder der Bilder verwendet wird. Die Koeffizienten c_{ij} sind dann geeignet zu modifizieren.

- [0052] Die Bestimmung der Koeffizienten c_{ij} kann mit dem im folgenden beschriebenen Meßverfahren unabhängig davon, ob die Phase und/oder die Modulationsfrequenz zur Bild- bzw. Wellenlängenkodierung eingesetzt werden, erfolgen. Für eine Referenzwellenlänge (beispielsweise 488 nm) wird im Sinne einer Eichung die Kodierfrequenz und die Kodierphase ermittelt (z. B. mittels eines Testobjektes wie einer Glasplatte oder eines Spiegels). Hierzu wird die periodische Struktur auf das Testobjekt abgebildet, mit dem Detektor vermessen und die Kodierfrequenz sowie die Kodierphase für eine feste Bildphase am Ort der Probe vermessen und damit bestimmt. Die Kodierphasen bzw. Kodierfrequenzen der anderen Wellenlängen können nun relativ zu dieser Referenz wiederum für eine feste Bildphase vermessen werden. In einer möglichen Anordnung wird die Phasenkodierung durch Dispersion (Parallelversatz) in einer planparallelen Platte P, die zugleich den Träger eines in Beleuchtungsrichtung davor angeordneten Amplitudengitters (Struktur S) darstellt, realisiert, siehe Abb. 7A. Durch den Durchgang von polychromatischem Anregungslicht durch die hier schwach um die Achse A geneigte planparallele Platte P (Neigung: γ , Dicke: d) ergibt sich ein geringfügiger, wellenlängenabhängiger Parallelversatz in der Ebene senkrecht zur Drehachse und zur optischen Achse:

$$\Delta x(\lambda) = d \cdot (\sin \gamma - \cos \gamma \cdot \tan \beta(\lambda)) \text{ mit } \beta(\lambda) = \sin^{-1}((\sin \gamma)/n(\lambda)).$$

[0053] Wenn sich die Platte in einer Zwischenbildebene (siehe **Abb. 9A**) der Mikroskopanordnung befindet, äußert sich dieser Versatz als Phasenverschiebung zwischen den Amplitudenmodulationen der einzelnen Anregungslinienfoki. **Abb. 8** zeigt schematisch einen Linienfokus in einem Scanfeld, wobei die Phasenlagen der Amplitudenmodulation für beispielsweise 3 verschiedene Anregungswellenlängen im Diagramm auf der rechten Seite dargestellt sind. Die x-Achse des Diagramms entspricht der Koordinate entlang des Linienfokus. In der rechten Abbildung der **Abb. 8** ist nur ein Ausschnitt der Scanlinie zur Verdeutlichung der Kodierphasen dargestellt.

[0054] Eine Phasenverschiebung von 5 Grad ist ausreichend zur sicheren Trennung der von der entsprechenden Wellenlänge angeregten Signale. Tabelle 1 gibt die Kodierphasen für ein konkretes Beispiel an.

Tabelle 1

[0055] Phasenverschiebung für wichtige Laserlinien durch Dispersion in einer 10 mm dicken BK7 Platte mit einem Amplitudengitter von 50 Linien/mm. Die Platte ist 5 Grad gegen die Normalen geneigt, so daß sich für die Referenzwellenlänge von 488 nm ein Parallelversatz von ca. 300 µm gegenüber der optischen Achse ergibt.

Wellenlänge (nm)	Relativer Versatz (µm)	Phasenverschiebung Für 50 Linien/mm (Grad)
458	1,08	19,5
476	0,36	6,5
488	0	0
514	-0,56	-10,1
532	-0,82	-14,8
543	-0,95	-17,1
633	-1,47	-26,5
1064	-2,75	-49,5

[0056] Eine Anordnung zur wellenlängenabhängigen Phasenverschiebung (Phasenkodierung) verwendet ein optisches Gitter, welches in einer Pupillenebene der Mikroskopanordnung – beispielsweise im Scanner eingesetzt wird.

[0057] Im folgenden werden vorteilhafte Anordnungen beispielhaft für Fluoreszenz und DIC-Bildgebung erläutert, ohne dass die Übertragbarkeit auf weitere optische Kontrastverfahren beschränkt wird.

Anordnung 1

Strukturierte Beleuchtung mit Einfachscanlinie

[0058] Eine erste Anordnung ist in **Abb. 9** gezeigt. Gestrichelt eingezeichnet ist der Pupillenstrahlengang der Mikroskopanordnung. Durchgezogene Linien stellen den Objektstrahlengang dar. In **Abb. 9A** (xy-Ebene) wird Licht der Lichtquelle (LQ) mit beispielsweise einer Zylinderlinse (ZL), in deren Brennweite sich eine Pupillenebene der Mikroskopanordnung befindet, zu einem Linienfokus in einer Zwischenbildebene (ZB) geformt. In einer Zwischenbildebene vor oder hinter der Zylinderlinse (dargestellt vor der Zylinderlinse) befindet sich ein Element (ST), das entlang der Scanlinie eine Amplitudenmodulation hervorruft. ST ist beispielsweise ein Transmissionsgitter. Wie in **Fig. 7B/7D** beispielhaft dargestellt, verläuft die Änderung der Periodizität senkrecht zur Richtung (Y) der als schwarze Striche schematisch dargestellten Gitterlinien in X-Richtung. Eine Verschiebung in dieser X-Richtung, beispielsweise mit der Positioniereinheit PE wie in den **Abb. 9** dargestellt, ermöglicht eine Änderung der Phasenlage. Eine Verschiebung der Struktur nach **Abb. 7D** in Y-Richtung (Verschiebung nicht dargestellt) resultiert in einer Variation der Frequenz der Amplitudenmodulation zur Anpassung der optischen Schnittdicke (siehe Text weiter unten) oder zur Änderung der Modulationsfrequenz bei der Aufnahme der Einzelbilder zur Berechnung des optischen Schnittbildes. Eine Verkipfung um einen Drehpunkt, der in der optischen Achse liegt und eine Drehachse in Y Richtung erzeugt ebenfalls diese Verschiebung. Eine Verdrehung des Gitters um eine Drehachse in Z-Richtung, die beispielsweise mit der optischen Achse übereinstimmt, erzeugt (s. a. **Abb. 16**) ebenfalls eine Phasenverschiebung, die bei Abbildung mehrerer räumlich getrennter Linien auf die Probe (Linienverlauf in X Richtung) unterschiedlich ausfällt.

[0059] Die strukturierte Scanlinie wird im folgenden über den Hauptstrahlteiler (MDB) und einen Scanner (y), der die Scanlinie senkrecht zur Linie bewegt (y-Koordinate) und sich wiederum in einer Pupille der Mikroskopanordnung befindet, durch die Scanoptik (SO), die Tubuslinse (TL) und das Objektiv (O) in die Probe (PR) abgebildet. Die Relayoptik (RL) bildet hierbei den Brennpunkt der Zylinderlinse (ZL) auf den Scanner (y) ab. Die Relayoptik kann in speziellen Anordnungen nach dem Stand der Technik auch weggelassen werden. Z. B. kann sie bei einer Verkürzung des Abstandes der beiden Scanner x und y oder beim Ersetzen der Scanner x und y durch einen kardanischn aufgehängten Einzelscanner entfallen. Die Zylinderlinse kann prinzipiell auch durch einen Zylinderspiegel ersetzt werden, dessen Brennpunkt auf

dem Scanner (X) liegt. Der Zylinderspiegel wird unter 45° in der in **Abb. 9C** gezeichneten xz-Ebene angeordnet. In dieser Ebene besitzt der Spiegel auch seine fokussierende Wirkung. Weiterhin wird durch den Spiegel der Strahlweg zur Lichtquelle um 90° abgelenkt. Dies ist in **Abb. 9c** schematisch dargestellt.

[0060] Das vom Objektiv (O) gesammelte Emissionslicht wird mit Hilfe beispielsweise des Hauptfarbteilers (MDB) vom Anregungslicht abgespalten. Im Anschluß wird das Licht der Probe mit Hilfe einer abbildenden Optik (PO) bei konfokaler Detektion durch eine Schlitzblende (SB) (Lage-Schlitz Längsrichtung in Z Richtung auf der Zeichnung) fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion kann die Blende entfallen. Hinter der Schlitzblende befindet sich ein Zeilen- oder Flächendetektor (DE) (Lage der Zeile in Z-Richtung) der ortsauflöst (entlang des Linienfokus) die Fluoreszenz detektiert. Zusätzlich kann ein Emissionsfilter (nicht dargestellt) zur Unterdrückung der Anregungsstrahlung im Detektionsstrahlengang nach dem Hauptfarbteiler (MDB) angeordnet werden. Der Linienfokus wird mit dem Galvoscanner (y) in einer Raumrichtung abgerastert. Falls der x-Scanner nicht zur Einstellung der Bildphase verwendet wird, dann verbleibt er in seiner Nulllage.

[0061] **Abb. 9B** zeigt die gleiche Anordnung jedoch diesmal um 90° Grad gespiegelt (YZ-Ebene). Statt einer Linie auf der Probe ist in dieser Raumrichtung aufgrund der in dieser Richtung nicht wirkenden Zylinderlinse (ZL) ein Fokuspunkt auf der Probe zu sehen.

[0062] Prinzipiell kann auch auf den Einsatz der Schlitzblende verzichtet werden. Dies ist vor allem dann sinnvoll, wenn die Abbildung der Fluoreszenz nicht über die Scanner descannt wird sondern direkt auf eine CCD-Kamera oder eine gegatete Kamera zur ortsauflösten Messung der Fluoreszenzlebensdauer (LaVision, Picostar) erfolgen soll. Die CCD-Kamera betrachtet hierbei eine Zwischenbildebene ZB z. B. in der Zwischenbildebene zwischen TL und SO der Mikroskopanordnung. An einem Mikroskop nach dem Stand der Technik wird sie an einen TV-Port (**Abb. 19** Lage TV-Port) angeschlossen. Zusätzlich kann eine CCD-Kamera im Transmissionsstrahlengang der Mikroskopanordnung (z. B. **Abb. 1** statt T-PMT) eingesetzt werden. Dadurch kann die von der Probe transmittierte Anregungsstrahlung mit konfokaler Auflösung detektiert werden. Zusätzlich wird auch eine konfokale DIC-Abbildung möglich. Das DIC Prisma wird hierzu nach dem Stand der Technik in der Objektivpupille zwischen TL und Objektiv O angebracht. Das mit DIC so gewonnene Bild kann weiterhin mit den Bildern, die durch von der Probe reflektierte, gestreute und/oder emittierte Signale erzeugt wurden, in einem Bild überlagert dargestellt werden. Die Berechnung des konfokalen Schnittes erfolgt beispielsweise durch die Aufnahme von mindestens 2 Phasenbildern (siehe **Abb. 4**, oder im Text weiter oben). Die Beleuchtungsintensität der Linien in den mindestens 2 Phasenbildern variiert dazu in x-Richtung periodisch – beispielsweise sinusförmig – aufgrund der Struktur ST. Die relative Bildphase bei Verwendung von 3 strukturierten Linien ist um jeweils 120° Phasen verschoben. Die 3 Phasenbilder werden sequentiell erzeugt, d. h. es werden nacheinander 3 Bilder mit Hilfe des y-Galvoscanners (y) gescannt. Die Struktur (ST) kann beispielsweise ein Transmissionsgitter sein. Die Verschiebung der Bildphase kann beispielsweise mit einer Positioniereinheit (PE), an die das Transmissionsgitter gekoppelt ist, erfolgen, so dass jeder Ort der zu untersuchenden Probe mit variierender Helligkeit betrachtet werden kann. Die Einstellung der Bildphase kann weiterhin bei einer Wellenlänge mit Hilfe einer drehbar gelagerten Platte (PL) wie in **Abb. 7A** erfolgen, der die Struktur vorgeordnet/aufgeprägt ist. Die Platte ist hierzu in einer Zwischenbildebene der Mikroskopanordnung anzuordnen wie in **Abb. 9** dargestellt.

[0063] Die hierbei verwendete planparallele Platte befindet sich in einer Zwischenbildebene, vorzugsweise wird die Struktur ST (dargestellt in **Abb. 7B**) direkt auf die Platte aufgebracht.

[0064] In einer weiteren Anordnung kann die Einstellung der Bildphase auch mit Hilfe eines weiteren Galvoscanners (X) erfolgen. Der Scanner (X) verstellt hierbei die Bildphase, indem er die Scanlinie in x-Richtung verschiebt. Dies hat den Vorteil, dass durch das Zuschalten (Einschwenken oder Einschieben) der Zylinderlinse (ZL) und des Transmissionsgitters gekoppelt mit einer detektionsseitigen Strahlumlenkung zur Umschaltung von einem Punktdetektor auf einen Zeilendetektor (DE) zwischen einem punktscannenden LSM und einem linienscannenden LSM mit strukturierter Beleuchtung umgeschaltet werden kann. Falls der Scanner X nicht zur Einstellung der Bildphase verwendet wird, so verbleibt er in seiner Nullstellung (ist also stromlos geschaltet).

Anordnung 2

Strukturierte Beleuchtung mit Einfachscanline und Kodierung der Modulationsphase bzw. Modulationsfrequenz

[0065] Eine zweite Anordnung verwendet verschiedene Kodierphasen in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungswellenlänge bei der Strukturierung der Scanlinie. Dadurch können die Signale der von den einzelnen Wellenlängen angeregten Fluoreszenz digital separiert werden. **Abb. 10A** zeigt einen möglichen schematischen Aufbau in der XZ-Ebene. Licht der Lichtquelle (LQ) der verschiedenen Wellenlängen erfährt mit Hilfe einer Struktur (ST) eine Amplitudenmodulation. Die Struktur befindet sich hierzu in einer Zwischenbildebene der Mikroskopanordnung. Die Struktur ist über eine Positioniereinheit (PE) verschiebbar angeordnet, so dass die Struktur entlang der Scanlinie verschoben und verschiedene Bildphasen eingestellt werden können. Anschließend wird das strukturierte Licht in einer Zylinderoptik (ZL) zu einer Linie in der Pupillenebene der Mikroskopanordnung geformt. Dazu wird die Zylinderlinse (ZL) im Abstand ihrer Brennweite von der Pupille (Scanner X) angeordnet. Die Einstellung der Bildphase kann weiterhin mit dem Scanner (X) erfolgen, der sich in einer Pupillenebene der Mikroskopanordnung befindet.

[0066] **Abb. 10B** zeigt eine vereinfachte Anordnung mit nur einem Scanner (Y) in der XZ-Ebene. Die Einstellung der Bildphase erfolgt hierbei durch die Positioniereinheit PE.

[0067] Nachdem der Scanlinie eine Amplitudenmodulation aufgeprägt wurde, gelangt die Strahlung durch ein Element in dem die Struktur wellenlängenabhängig (ST) verschoben und damit die Kodierphase wellenlängenabhängig variiert wird. Eine mögliche Anordnung zur Phasenkodierung wurde bereits anhand von **Abb. 7A** beschrieben. Die hierbei verwendete planparallele Platte befindet sich in einer Zwischenbildebene, vorzugsweise wird die periodische Struktur ST (dargestellt unter anderem in **Abb. 7B**) direkt auf die Platte aufgebracht.

[0068] Im Anschluß an die Phasen- bzw. Frequenzkodierung der Amplitudenmodulation gelangt die Anregungsstrah-

lung über den Hauptfarbteiler (MDB), den Y-Scanner, die Scanoptik (SO), die Tubuslinse (TL) und das Objektiv (O) in die Probe (PR). Der Y-Scanner rastert die Scanlinie zur Aufnahme eines Phasenbildes in der y-Koordinate ab. In Abhängigkeit von den verwendeten Farbstoffen erfolgt die Fluoreszenzanregung mit den entsprechenden Wellenlängen. Die Modulationsfrequenz und Modulationsphase der Scanlinie in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge überträgt sich auf diese Art auf das Fluoreszenzsignal. Bei einer descannten Detektion werden die Fluoreszenzen vom Objektiv gesammelt und gelangen über die Tubuslinse, Scanoptik und den Y-Scanner zum Hauptfarbteiler (MDB). Dieser trennt die Fluoreszenz von der Anregungsstrahlung. Im Anschluß wird die Fluoreszenz durch eine Schlitzblende auf einen Zeilendetektor (DE) abgebildet. Zur Unterdrückung der Anregungsstrahlung können zusätzlich Blockfilter vor den Zeilendetektor geschaltet werden. Die Schlitzblende kann insbesondere bei einer Mehrphotonenanregung entfallen. Die Trennung der einzelnen Signalanteile, die von den verschiedenen Wellenlängen generiert wurden, und die Berechnung der optischen Schnitte erfolgt anhand des oben beschriebenen Algorithmus beispielsweise unter Verwendung der Kodierphasen bei gleicher Modulationsfrequenz, wobei die Kodierphasen der einzelnen Wellenlängen mit Testobjekten wie Planspiegeln vorher bestimmt worden sind. Es können somit Regionen die mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt wurden, getrennt sichtbar gemacht werden.

[0069] Eine weitere Anordnung verwendet ein dispersives Element (DG), z. B. ein Transmissionsgitter, das sich in einer Pupillenebene der Mikroskopanordnung befindet. Das Optikschemata ist in Abb. 11 in der XZ-Ebene dargestellt. Das Transmissionsgitter verschiebt die einzelnen Scanlinien entsprechend ihrer Wellenlänge innerhalb der Zeichenebene (nur eine WL dargestellt). Dadurch wird den einzelnen Scanlinien entsprechend ihrer Wellenlänge eine unterschiedliche Phasenlage der Modulationsstruktur ST (Kodierphase) aufgeprägt. Die Verschiebung der Bildphase erfolgt mit Hilfe der Positioniereinheit (PE) und der Modulationsstruktur S für jede Wellenlänge mit einer identischen Schrittweite. Dadurch wird sichergestellt, dass die Bildphasenverschiebung für jede Anregungswellenlänge beispielsweise bei einer Aufnahme von 3 Phasenbildern 120° beträgt.

[0070] Im folgenden wird auf vorteilhafte Anordnungen zur Erzeugung der Frequenzkodierung bzw. der Anpassung der optischen Auflösung näher eingegangen.

[0071] Durch Verändern der Modulationsfrequenz für jede Anregungswellenlänge kann die effektive Pinholegröße, d. h. die optische Schnittdicke für die einzelnen Wellenlängen angepaßt werden.

[0072] Abb. 7C zeigt schematisch eine Vorrichtung zur wellenlängenabhängigen Einstellung der Modulationsfrequenzen, die vorteilhaft in den Anordnungen 1 und 2 (wie zum Beispiel in Abb. 9) in eine Zwischenbildebene der Mikroskopeinrichtung anstelle der Struktur ST eingebaut wird. Dabei wird eine polychromatische Lichtquelle mit einem dispersiven Element (DG1) in seine spektralen Anteile räumlich aufgespalten. Im Anschluß werden die spektralen Anteile mit einer ersten Linse (Linse 1, Brennweite f) axialparallel gemacht, d. h. DG1 steht im Brennpunkt der Linse. In der abbildungsseitigen Brennebene der Linse befindet sich die Struktur (ST) mit der die Amplitudenmodulation erfolgt. Eine mögliche Ausbildung der Struktur mit linearer Abhängigkeit der Frequenz in y-Richtung ist in Abb. 7D schematisch dargestellt.

[0073] Die gemäß 7C) erfolgte Aufspaltung in Linien L1, L2, L3 erzeugt auf dieser periodischen Struktur durch die unterschiedliche Lage der Linien in y-Richtung unterschiedliche Modulationsfrequenzen.

[0074] Erfolgt also eine von der Wellenlänge linear abhängige räumliche Aufspaltung der polychromatischen Lichtquelle, z. B. mit einem Transmissionsgitter, so ändern sich bei geeigneter Gitterauslegung auch die Modulationsfrequenzen der einzelnen spektralen Anteile in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Dadurch kann z. B. sichergestellt werden, daß die gleiche optische Schnittdicke bei verschiedenen Wellenlängen realisiert wird. Im Anschluß werden die einzelnen spektralen Anteile mit Hilfe einer zweiten Linse (Linse 2, Brennweite f , die nicht identisch der Brennweite der Linse 1 sein muß) und einem weiteren dispersiven Element (DG2, z. B. Transmissionsgitter, das nicht identisch DG1 sein muß) wieder räumlich überlagert. Durch die Anpassung der Brennweiten der Linsen 1 und 2 kann die Strahlaufweitung kontrolliert und damit die Ausleuchtung des Mikroskopobjektivs optimiert werden.

[0075] Insgesamt ergeben sich mit einer solchen Struktur folgende vorteilhafte Varianten der Erfindung:

a) Durch eine Verschiebung in x-Richtung der Struktur ST kann für die einzelnen Linien eine (nach vorheriger Kalibrierung) definierte unterschiedliche Phasenänderung erzeugt werden, wobei bei den unterschiedlichen Phasenlagen jeweils eine vollständige Abtastung der Probe mittels der jeweiligen Linie erfolgt und wellenlängenabhängige Schnittbilder berechnet werden.

Die Schnittdicke dabei kann durch definierte Verschiebung der Frequenz über Verschiebung in y-Richtung verändert werden.

b) Durch (mindenstens eine) Verschiebung in y-Richtung wird die Modulationsfrequenz definiert verändert und dadurch können durch mehrmaliges Abscannen bei unterschiedlichen Modulationsfrequenzen für die einzelnen Wellenlängen Schnittbilder berechnet werden.

Über die unterschiedlichen Modulationsfrequenzen der Struktur kann weiterhin eine Frequenzkodierung/Phasenkodierung für unterschiedliche Wellenlängen bei Abbildung aller Wellenlängen auf einer gemeinsamen Zeile erzeugt werden (siehe Anordnung 4).

[0076] Statt der in Abb. 7D gezeigten Struktur mit kontinuierlicher Änderung der Modulationsfrequenz in y-Richtung kann eine Struktur (s. a. Abb. 16), die sich aus mehreren Teilstrukturen verschiedener Modulationsfrequenz zusammensetzt, verwendet werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass die Struktur nur für feste Anregungswellenlängen abgeglichen ist. Im einfachsten Falle können jedoch auch verschiedene Gitter ST mit jeweils verschiedener Modulationsfrequenz in die Anordnungen 1 und 2 eingeschwenkt werden.

[0077] In einer weiteren nicht gezeigten Anordnung passiert die Strahlung nach der Strukturierung ein Element, in dem die Struktur wellenlängenabhängig vergrößert und damit die Modulationsfrequenz wellenlängenabhängig variiert, d. h. eine Frequenzkodierung durchgeführt wird. In einer ersten Anordnung wird die Scanlinie mittels dichroitischen Strahlteilern in ihre einzelnen Wellenlängenanteile zerlegt und im Anschluß in den Teilstrahlengängen eine wellenlängenab-

hängige Vergrößerung mit jeweils einem Teleskop mit Zoomoptik zur Einstellung der Vergrößerung aufgeprägt. Mit Hilfe weiterer Dichroiten werden die einzelnen Scanlinien wieder überlagert. Als Alternative können in einer weiteren Anordnung auch spezielle diffraktive Elemente, die eine wellenlängenabhängige Vergrößerung der Scanlinie generieren, verwendet werden.

5 [0078] Am Ausgang besitzt die Scanlinie in Abhängigkeit von der verwendeten Wellenlänge eine spezifische Kodierfrequenz der Amplitudenmodulation. Die Verschiebung der Bildphase erfolgt mit Hilfe der Positioniereinheit (PE) und der verschiebblichen Struktur ST für jede Wellenlänge mit einer identischen Schrittweite. Dadurch wird sichergestellt, dass die Bildphasenverschiebung für jede Anregungswellenlänge beispielsweise bei einer Aufnahme von 3 Phasenbildern 120° beträgt. Statt der Aufnahme von Phasenbildern kann der optische Schnitt auch aus 2 Bildern berechnet werden, bei denen die Modulationsfrequenz pro Anregungslinie in den beiden Bildern verschieden ist. Die Änderung der Modulationsfrequenz für alle oder eine Wellenlänge kann vorteilhaft durch die Aufnahme der beiden Bilder bei verschiedenen Stellungen in y-Richtung des Transmissionsgitters nach Abb. 7D erfolgen.

10 [0079] Es kann durch die oben beschriebenen Anordnungen z. B. sichergestellt werden, dass die axiale optische Auflösung des Mikroskops für verschiedene Wellenlängen gleich ist. Dadurch werden sogenannte Kolokalisationsmessungen mit einem Linienscanner möglich. Zusätzlich kann z. B. bei sehr schwachen Fluoreszenzsignalen das effektive Pinhole durch Verschiebung der Struktur in Y-Richtung siehe Abb. 7D, hier nach unten, vergrößert werden. Dadurch verringert sich zwar die optische Auflösung, jedoch kann das Signal- zu Rauschverhältnis verbessert werden.

15 [0080] Zusätzlich kann die oben beschriebene nicht dargestellte Zoomoptik dazu dienen, den chromatischen Längsfehler der abbildenden Optik zu kompensieren und damit sicher zu stellen, daß der optische Schnitt in der jeweils gleichen Objektebene erfolgt. Dazu wird jeweils eine Linse der einzelnen Zoomoptiken leicht in Abhängigkeit vom verwendeten Mikroskopobjektiv dejustiert, so dass der Strahl für die einzelnen Wellenlängen am Ausgang der Zoomoptik divergent oder konvergent auf die Objektivpupille trifft und dadurch der Fokus in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge in axialer Richtung verschoben, d. h. für alle Anregungswellenlängen zur Deckung gebracht werden kann.

20 [0081] Zusätzlich zu Ausführung 1 und 2 kann ein weiteres dispersives Element (PR) der zusätzlichen spektralen Aufspaltung der Fluoreszenzsignale senkrecht zur Beleuchtungslinie dienen (multispektraler Linienscanner). Abb. 12 zeigt das Detektionsschema einer CCD Fläche des multispektralen Linienscanners in der XZ-Ebene. In der x-Richtung des Detektors (DE) werden die strukturierten Emissionssignale für die jeweiligen Wellenlängen abgebildet.

25 [0082] Alternativ zur Verschiebung der Phasenlage mittels PE kann die Einstellung der Bildphase auch hier durch den X-Scanner erfolgen.

30 [0083] Für jede Scanstellung der Scanlinie erfolgt die Aufnahme eines Bildes wie dargestellt für unterschiedliche Wellenlängen der Detektion. Die frei programmierbare Ansteuerung ausgewählter Detektorelemente (Zeilen) und die Kombination von Detektorelementen einer Spalte der Detektormatrix erlaubt eine flexible Auswahl von Spektralbereichen der Fluoreszenz-Emission. Hierzu können mehrere Zeilen des Detektors, in die verschiedene Fluoreszenzsignale entsprechend ihrer Wellenlänge abgebildet werden, elektronisch zusammengeschaltet werden. Die multispektrale Detektion der Fluoreszenzemission kann wiederum mit der strukturierten Beleuchtung kombiniert werden. Dazu wird die linienförmige Anregung zusätzlich z. B. mittels eines Transmissionsgitters (ST) strukturiert. Hierbei erfolgt ein kompletter Scanvorgang der Scanlinie unter Detektion jeweils der Wellenlängenverteilung entsprechend der Abbildung in Fig. 12 und weitere Scanvorgänge unter Änderung der Bildphase der Gitterstruktur. Da zur Ermittlung eines wellenlängenabhängigen Versatzes beispielsweise eine verwendete Planplatte PL definiert verkippt wurde, kann die Änderung der Phasenlage beispielsweise durch Verschiebung mit PE bei konstantem Kippwinkel erfolgen. Durch sequentielle Detektion von Bildern strukturierter Objekte mit unterschiedlichen Bildphasen der Anregung und nachfolgender Berechnung kann wieder der Tiefenkontrast optimiert werden. Abb. 12 zeigt die Kombination eines multispektralen Linienscanners (spektrale Aufspaltung erfolgt in der y-Ebene also in die Zeichenebene hinein) mit strukturierter Beleuchtung über die Struktur ST, wobei die Phasenkodierung in wiederum mit einer verkippten und in senkrecht zur optischen Achse verschobenen planparallelen Platte (hier nicht dargestellt) oder mit einem dispersiven Element (siehe Text oben) erfolgt. Die Bildphase wird sequentiell variiert. Die unterschiedlichen spektralen Anteile werden parallel mittels CCD-Array detektiert.

40 [0084] Die Schlitzblende (SB), die hier als Eintrittsspalt der spektralen Aufspaltung dient, kann bei descannter Detektion im Linienscanner entfallen. Dadurch verringert sich zwar die spektrale Auflösung, jedoch wird der technische Aufwand erheblich erleichtert, da sonst verschiebbare Einzelschlitzblenden verwendet werden müssen.

50 [0085] Abb. 13 zeigt schematisch den Aufbau der Elektronik zur Detektion der Signale mit einem Zeilendetektor. Signale des Detektors K1-N werden hierzu mit Hilfe eines jeweils eines Strom-Spannungs-Wandlers (A) verstärkt und anschließend während der Pixelverweilzeit aufintegriert (I). Nach einer weiteren Verstärkung zur Pegelanpassung an einen Analog-/Digital Wandler (ADC) werden diese im ADC in digitale Signale gewandelt und an einen Rechner (PC) übertragen. Die Detektion mit einer CCD Matrix ist aus der Literatur bekannt.

Anordnung 3

Strukturierte Beleuchtung mit quasisimultaner Aufnahme der Phasenbilder

60 [0086] Die Detektion der Streifenbilder kann auch quasi simultan geschehen, indem statt eine Linie parallel mehrere Linien (z. B. L1, L2, L3) in die Probe abgebildet werden, wobei die Intensitätsstruktur (Bildphase) beispielsweise analog Abb. 4 jeweils um z. B. 120° bei Verwendung von beispielsweise drei Linien verschoben ist (Abb. 14). Somit wird beim einmaligen Scannen der Probe bereits die gesamte Information zur Auswertung der Daten generiert. Abb. 15 zeigt schematisch den optischen Aufbau in der YZ-Ebene. Jeweils eingezeichnet sind die Fokuspunkte entlang der y-Achse der Linienfoki. Das Anregungslicht kann mit einer Strahlteileranordnung (T) aufgespalten werden. Zwei Ausführungsformen der Strahlteileranordnung (T) sind in Abb. 16A/B, hier der Zylinderlinse vorgeordnet, gezeigt. Die erste Anordnung im Zusammenwirken mit der Zylinderlinse erzeugt mehrere diskrete Linienfoki mit zwei parallel angeordneten Spiegeln, wobei der erste Spiegel ein Vollspiegel und der zweite Spiegel ein teildurchlässiger Spiegel ist. Die Transmission des

teildurchlässigen Spiegels ist abgestimmt auf jeden Teilstrahl (i) und ergibt sich aus $100\%/(n-i)$, wobei n die Gesamtzahl der Einzelfoki ist. Die Anteile (i) gelangen im Anschluß separat in eine spezielle Gitterstruktur (ST), die schematisch in **Abb. 16A** dargestellt ist. Die Teilgitter sind bei dieser Struktur definiert phasenversetzt moduliert. Anstatt der aus Teilgittern zusammengesetzten Struktur kann auch ein Transmissionsgitter nach **Abb. 7B**, wie in **Abb. 16A** dargestellt, verwendet werden, womit der Phasenversatz der Struktur für die einzelnen Scanlinien bei jeweils gleicher Modulationsfrequenz gezielt eingestellt werden kann. Die Eichung der Vorrichtung, d. h. die Bestimmung der Modulationsfrequenz und der Phasenlagen der Scanlinien erfolgt nach dem oben beschriebenen Verfahren. Die Struktur befindet sich in einer Zwischenbildebene der Mikroskopanordnung. Die Teileranordnung kann beispielsweise auch in einer Pupillenebene der Mikroskopanordnung eingesetzt werden. Hierbei werden beide Spiegel gegeneinander verkippt, so dass wiederum mehrere Linienfoki entstehen.

[0087] Die zweite Anordnung in **Abb. 16** (**Abb. 16B**) ist eine spezielle Anordnung zur Erzeugung eines Doppellinienfokus. Die Anordnung verwendet wiederum zwei parallel angeordnete Spiegel (SP1 und SP2), wobei ein Spiegel (SP1) die Struktur ST selbst trägt. Die Struktur ist reflektierend an den Stellen geringer Transmission. Die Struktur wird im Zwischenbild der Mikroskopanordnung angeordnet. Am Ausgang des Teilers entstehen 2 Linien, deren Amplitudenmodulation genau gegenphasig ist. Die Linie 1 trägt somit exakt eine gegenüber der Linie 2 um 180° verschobene Amplitudenmodulation. Die Struktur ist auf Glasplatte 1 aufgebracht. Bei Verwendung von mehreren Wellenlängen wird der wellenlängenabhängige Parallelversatz in y-Richtung durch die planparallele Glasplatte durch eine unter einem Winkel von 90° angeordnete 2te Glasplatte gleicher Dicke kompensiert. Zusätzlich kann die gesamte Teileranordnung (T) zur Erzeugung der oben beschriebenen Phasenkodierung leicht um die y-Achse verkippt werden. Eine Verschiebung der Struktur (ST) kann bei beiden Anordnungen entfallen. Die Scanbewegung des Y-Scanners erfolgt über das eigentliche zu untersuchende Bildfeld hinaus, so dass jeder zu untersuchende Punkt der Probe einmal mit jeweils einer Linie unterschiedlicher Phasenlage der Struktur beleuchtet wird. Diese Anordnung ist besonders vorteilhaft für die Untersuchung von sich schnell verändernden Proben, da sich Bewegungen oder schnelle Veränderungen in der Probe nicht mehr störend auf die Messung auswirken und die maximale Bildaufnahme-Geschwindigkeit des Linienscanners nicht durch die sequentielle Datenaufnahme reduziert wird. Die Detektion der parallel angeregten Linien erfolgt hierbei mit einem Matrixdetektor, im Falle von beispielsweise 3 Linien mit einem 3-Zeilendetektor. Alternativ kann auch ein Zeilendetektor zur Anwendung kommen, auf dem alle auf der Probe separierten Linien simultan detektiert werden. Die Separation der Information von jeder Linie kann durch den oben beschriebenen Algorithmus auf der Grundlage der verschiedenen Modulation (in Phase und 1 oder Frequenz) jeder Linie erfolgen.

Anordnung 4

Strukturierte Beleuchtung mit quasisimultaner multispektraler Anregung

[0088] In einer vierten Anordnung werden mehrere diskrete Anregungswellenlängen räumlich getrennt in verschiedene Scanlinien (z. B. bei 3 Laserlinien: L1, L2, L3 in x-Richtung) in die Probe abgebildet. Dazu werden durch ein dispersives Element (PR) (z. B. Transmissionsgitter, Gitterlinien in x-Richtung) mehrere parallele Anregungslinien unterschiedlicher Wellenlänge erzeugt (siehe **Abb. 17**), die mittels des y-Galvoscaners (y) und nachfolgender optischer Abbildung so über die Probe bewegt werden, dass jeder Punkt im interessanten Scanfeld mindestens einmal von jeder Linie gescannt wird. Der optische Aufbau ist in **Abb. 18** schematisch in der YZ-Ebene gezeigt. Jeweils eingezeichnet sind die Strahlschwerpunkte der Linienfoki.

[0089] Die Abspaltung der Fluoreszenzsignale von der Anregung erfolgt wiederum mit dem Hauptfarbteiler (MDB). Dabei gelangen die Fluoreszenzsignale, die durch die verschiedenen Anregungslinien erzeugt wurden, auf unterschiedliche Positionen L1-L3 in z-Richtung eines Matrixdetektors mit vorgeordneten Schlitzblenden in x-Richtung, wobei die Achse senkrecht zur Beleuchtungslinie der entsprechenden Wellenlänge der Fluoreszenz entspricht. Die Achse entlang der Beleuchtungslinie auf dem Matrixdetektor entspricht hierbei der Ortskoordinate.

[0090] Zusätzlich kann auch eine Phasen- bzw. Frequenzkodierung entsprechend den Anordnungen 1 und 2 erfolgen. Beispielsweise zur Phasenkodierung wird die Struktur (ST) um die Y-Achse verkippt. Eine Frequenzkodierung kann z. B. mit den in **Abb. 7D** gezeigten speziellen Struktur erfolgen. Die spektralen Anteile können bei Einsatz einer Phasen- bzw. Frequenzkodierung wiederum simultan mit einer Detektormatrix, die alle Scanlinien simultan erfaßt, detektiert werden. Dazu wird im einfachsten Falle eine CCD-Zeile mit rechteckigen Pixeln (oder zusammengeschalteten Zeilen) verwendet, wobei die längeren Seiten der Pixel vorteilhaft in Richtung z (siehe **Abb. 18**) ausgerichtet sind, so dass beispielsweise die Scanlinien L1 bis L3 gemeinsam mit der Detektorzeile detektiert werden. Die Trennung der Signale, die durch die verschiedenen Scanlinienfoki angeregt wurden, erfolgt dann wiederum nach dem oben beschriebenen Algorithmus. Der Vorteil dieser Anordnungen liegt darin, dass die einzelnen Scanlinien nicht mehr getrennt auf einem Detektorarray detektiert werden müssen, sondern mit einem eindimensionalen Detektor erfaßt werden können.

[0091] Zusätzlich kann ein weiteres dispersives Element der zusätzlichen spektralen Aufspaltung der Fluoreszenzsignale senkrecht zur Beleuchtungslinie dienen. Hierzu kann wiederum das in **Abb. 12** gezeigte Detektionsschema des multispektralen Linienscanners eingesetzt werden. In einer Richtung des Detektors wird eine Ortskoordinate abgebildet. Die frei programmierbare Ansteuerung ausgewählter Detektorelemente (Zeilen) und die Kombination von Detektorelementen einer Spalte der Detektormatrix erlaubt eine flexible Auswahl von Spektralbereichen der Fluoreszenzemission. Hierzu können mehrere Zeilen des Detektors, in die verschiedene Fluoreszenzsignale entsprechend ihrer Wellenlänge abgebildet werden, elektronisch zusammen geschaltet werden. Die multispektrale Detektion der Fluoreszenzemission kann wiederum mit der strukturierten Beleuchtung kombiniert werden. Dazu wird die linienförmige Anregung zusätzlich z. B. mittels eines Transmissionsgitters strukturiert. Durch sequentielle Detektion von Bildern strukturierter Objekte mit unterschiedlichen Bildphasen und nachfolgender Berechnung kann wieder der Tiefenkontrast optimiert werden. **Abb. 18** zeigt die Kombination eines multispektralen Linienscanners mit strukturierter Beleuchtung. Die Bildphase wird mit verschiedenen Strukturen sequentiell variiert. Die unterschiedlichen spektralen Anteile werden beispielsweise parallel mit-

tels CCD-Array detektiert. Als konfokale Schlitzblenden müssten nach dem Stand der Technik in dieser Anordnung mehrere zu den einzelnen Scanlinien konjugiert angeordnete und frei bewegliche Blenden verwendet werden, die jedoch durch die Strukturierung der Scanlinien entfallen können. Dadurch wird der technische Aufwand erheblich erleichtert.

Anordnung 5

Strukturierte Beleuchtung mit punktförmiger Probenwechselwirkung

- [0092] In einer fünften Anordnung erfolgt statt einer linienförmigen Anregung der Probe eine punktförmige Anregung der Probe. Dazu wird das Laser Scanning Mikroskop entsprechend Abb. 1 nach dem Stand der Technik betrieben. Jedoch wird eine Struktur (ST) entsprechend Abb. 19 in einer Zwischenbildebene verwendet, die in Probenrichtung nach den Scannern x und y angeordnet ist. Durch das Scannen in x- bzw. y-Richtung wird die Struktur sukzessive in die Probe abgebildet. Die Aufnahme der Phasenbilder erfolgt durch ein Verschieben der Struktur mit PE. Zusätzlich kann auch eine quasisimultane Beleuchtung nach Anordnung 3 und 4 erfolgen. Eine Phasenkodierung bzw. Frequenzkodierung mit den oben beschriebenen Anordnungen ist ohne Einschränkung übertragbar. Der Vorteil dieser Anordnung gegenüber einem herkömmlichen Punktscanner ist, dass das Signal der Probe ohne descanning direkt mit einer CCD-Kamera gemessen werden kann. In diesem Falle wird auch auf die konfokale Blende verzichtet. Als CCD Kamera kann beispielsweise auch eine gegatete Kamera (Picostar, La Vision) verwendet werden. Dadurch können beispielsweise zeitaufgelöste Fluoreszenzaufnahmen von konfokalen optischen Schnitten erzielt werden. Dies ist nach dem Stand der Technik nur durch den Einsatz nichtlinearer Probenwechselwirkungen möglich.
- [0093] Es kann jedoch auch eine descannte punktförmige Detektion bzw. partiell descannte Detektion (Lit.: Stimson et al., Rev. Of Sc. Instr., (70), p3351, 1999) nach dem Stand der Technik erfolgen.
- [0094] Durch die Phasenkodierung bzw. Frequenzkodierung können mit den beschriebenen Detektionsvarianten weiterhin die Signale der Probe, angeregt durch verschiedene Wellenlängen, simultan aufgezeichnet werden. Dabei ist nur ein Detektor notwendig. Durch die Anordnung kann somit der Aufbau eines Laser Scanning Mikroskops entscheidend vereinfacht werden ohne dass die Flexibilität eingeschränkt wird. Durch das Einschalten der Struktur kann zwischen einem herkömmlichen Laser Scanning Mikroskop und einem Laser Scanning Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung hin und her geschaltet werden.
- [0095] Eine Kombination der Verfahren 1–5 ist ebenfalls Teil der Erfindung. Weiterhin ist auch eine Kombination der oben beschriebenen Verfahren mit sogenannten parallel scannenden Verfahren nach dem Stand der Technik ohne Einschränkung möglich. Bei diesen Verfahren erfolgt eine Abbildung mehrerer Punkte oder Linien gleicher Intensität simultan als Matrix in die Probe (Lit.: Buist et al., J. o. Microscopy (192), p217, 1998/Nielsen et al., J. o. Microscopy (201), p852, 2000). Dadurch können die Bildaufnahmeraten nochmals gesteigert werden. Weiterhin kann die Probe mit einem Tischscanner oder einem Scanner nach dem Stand der Technik (z. B. Nipkow-Scheibe) abgebildet werden.
- [0096] Die beschriebenen vorteilhaften Anordnungen können zusätzlich auch zur Untersuchung von makroskopischen Proben vorteilhaft eingesetzt werden. Makroskopische Proben werden beispielsweise beim Screenen von Wirkstoffen auf einem Chip eingesetzt. Die Kantenlänge der Scanfelder betragen hierbei einige 10 mm. Diese Scanfelder können z. B. durch eine Vergrößerung der Scanwinkel der Galvoscaner durch eine Anordnung der Probe in einem Zwischenbild der Mikroskopanordnung Beispielhaft in Fig. 2 oder durch eine spezielle Objektivanordnung (Makroobjektiv), die das Zwischenbild vergrößert auf die Probe abbildet erzielt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur tiefenaufgelösten optischen Erfassung einer Probe, mit einer scannenden Bewegung von einer auf oder in einer Probe erzeugten Beleuchtungsverteilung mindestens einer Wellenlänge über die Probe oder zumindest einen Teil der Probe und Detektion insbesondere des aufgrund von Wechselwirkung mit der Probe beeinflussten Lichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes und/oder reflektierten Lichtes und/oder Lumineszenzlichtes und/oder gestreuten und/oder transmittierten Lichtes
- wobei das Beleuchtungslicht eine Modulation in zumindest einer Raumrichtung aufweist
- und die scannende Bewegung und zur Scanbewegung zugeordnete Detektion zumindest bei einer ersten und einer zweiten unterschiedlichen Phasenlage der Modulation und/oder ersten oder zweiten Frequenz der Periodizität der Modulation erfolgt und mindestens ein optisches Schnittbild durch die Probe/den Probenteil berechnet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Modulation durch Aufprägen mindestens einer zumindest eindimensional räumlich periodischen Struktur erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine Abbildung der Lichtverteilung auf die Probe erfolgt.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Schnittbild bildlich dargestellt wird.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine optische Abbildung einer periodischen Struktur erfolgt.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Interferenzmuster der Probe aufgeprägt wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Frequenzen und Phasenlagen der Struktur gleichzeitig auf die Probe abgebildet werden.
8. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Frequenzen und/oder Phasenlagen der Struktur sequentiell auf die Probe abgebildet werden.
9. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Beleuchtung durch mindestens eine linienförmige Lichtverteilung erfolgt, die in der schmalen Richtung eine bis zu beugungsbegrenzte Ausdehnung

und in der anderen, dazu rechtwinkligen Richtung ein Vielfaches dieser Ausdehnung aufweist.

10. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Abtastung mittels der Scanbewegung punktwise erfolgt.

11. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei innerhalb eines Scanfeldes eine Scanbewegung eines Linienmusters und/oder mindestens eines ein- oder zweidimensionalen Punktmusters erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei ein zusammengesetztes Bild aus den abgescannten Linien- und/ oder Punktmustern erzeugt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei ein äquidistantes Raster von Linien- und/oder Punktmustern verwendet wird.

14. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen enthält.

15. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei n Wellenlängen mindestens n + 1 Phasenlagen der Struktur detektiert werden.

16. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Phase und/oder Frequenz für jede Wellenlänge zur Erzeugung von Kodierwerten unterschiedlich eingestellt wird.

17. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine wellenlängenabhängige Phasenkodierung und/oder Frequenzkodierung des Beleuchtungslichtes erfolgt und jeweils pro Wellenlänge mittels der Kodierung das optische Schnittbild berechnet wird.

18. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Scanvorgang mit einer Linie mit mehreren Wellenlängen erfolgt.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Scanvorgang mit mehreren Linien gleichzeitig erfolgt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei mit einer oder mehreren Wellenlängen beleuchtet wird.

21. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei der Berechnung von Phasenbildern ($I_j(x)$) mit der Bildphase: (ϕ_i) mit Phasenkodierung der Anregungswellenlänge (ϕ_j) Bilder berechnet werden, die für die jeweilige j-te Wellenlänge charakteristische Bildinformationen vom pseudokonfokalen Schnitt (C_j) und vom Hintergrund (B_j) enthalten:

$$I_0(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_0) + B_j(x)$$

$$I_1(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_1) + B_j(x)$$

$$I_2(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_2) + B_j(x)$$

...

$$I_n(x) = \sum_{j=1}^n C_j(x) \cdot \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_n) + B_j(x)$$

wobei

$$\begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & \dots \\ c_{21} & c_{22} & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & c_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \dots \\ C_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_1 - I_0 \\ I_2 - I_0 \\ \dots \\ I_n - I_0 \end{pmatrix}$$

mit $c_{ij}(x) = \cos(k \cdot x + \phi_j + \phi_i) - \cos(k \cdot x + \phi_j)$

22. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert.

23. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, unter Verwendung einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist.

24. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Erzeugung optischer Schnittbilder mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung durch Aufnahme von Einzelbildern mit jeweils verschiedener Modulationsfrequenz und/oder Bildphase erfolgt.

25. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch Änderung der Modulationsfrequenz die optische Schnittdicke variiert wird.

26. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Phasenkodierung bei simultaner Abbildung verschiedener Wellenlängen und/oder Linienfoki auf einen gemeinsamen Detektor erfolgt.

27. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Frequenzkodierung bei simultaner Abbildung verschiedener Wellenlängen und/oder Linienfoki auf einen gemeinsamen Detektor erfolgt.

28. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Wellenlängen zeitlich simultan auf die Probe abgebildet werden.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Abbildung räumlich getrennt oder auf einen gemeinsamen Ort der Probe erfolgt.
- 5 30. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Wellenlänge auf die Probe abgebildet wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Abbildung mehrfach räumlich getrennt oder auf einem Ort der Probe erfolgt.
32. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Lichtverteilung auf der Probe linien- oder punktförmig ausgebildet ist.
- 10 33. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder erfolgt.
34. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Linien und/oder punktförmige Lichtverteilungen erzeugt werden.
- 15 35. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine parallele Aufnahme von Einzelbildern erfolgt.
36. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei mehreren Wellenlängen die Schnittdicken durch jeweilige Änderung der Modulationsfrequenz vorzugsweise gleich eingestellt werden.
37. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Detektion mit Punktdetektor und/oder Zeilendetektor und/oder Matrixdetektor erfolgt.
- 20 38. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine wellenlängenabhängige Phasenkodierung durch eine Anordnung zur Erzeugung eines wellenlängenabhängigen Parallelversatzes entlang der periodischen Struktur erfolgt.
39. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine wellenlängenabhängige Phasenkodierung durch eine verkippte Platte in einem Zwischenbild erfolgt.
- 25 40. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine wellenlängenabhängige Phasenkodierung durch ein dispersives Element erfolgt.
41. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine wellenlängenabhängige Phasenkodierung durch eine optische Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist wobei die Struktur um die optische Achse verdrehbar ist, erfolgt.
- 30 42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die spektrale Aufspaltung in einem Zwischenbild erfolgt.
43. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen mittels einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist, mit
- 40 Einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert, erfolgt.
44. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen erfolgt, indem wellenlängenabhängig der Abbildungsmaßstab verändert wird.
- 45 45. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen mit einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist, mit einer aus mehreren Teilen unterschiedlicher Periodizität zusammengesetzten Struktur erfolgt.
- 50 46. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase erfolgt.
47. Verfahren nach Anspruch 46, wobei eine Verschiebung der periodischen Struktur senkrecht zur optischen Achse erfolgt.
48. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase durch Lageverstellung eines Scanners erfolgt.
- 55 49. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase durch Verkipfung einer planparallelen Platte erfolgt.
50. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei jeweils geänderter Modulationsfrequenz erfolgt.
- 60 51. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei jeweils geänderter Modulationsfrequenz durch eine wellenlängenabhängige Änderung des Abbildungsmaßstabes erfolgt.
52. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei jeweils geänderter Modulationsfrequenz durch Einschwenken verschiedener Strukturen mit unterschiedlicher Periodizität erfolgt.
- 65 53. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei jeweils geänderter Modulationsfrequenz durch eine Verschiebung einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) än-

dert, senkrecht zur Periodizität, erfolgt.

54. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtverteilungen auf der Probe erzeugt werden und eine parallele Aufnahme der Einzelbilder erfolgt.

55. Verfahren nach Anspruch 54, mit der Erzeugung mehrerer Lichtverteilungen auf der Probe bei einer Wellenlänge, insbesondere durch

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur die als Strahlteiler wirkt.

56. Verfahren nach Anspruch 54, unter Erzeugung mehrerer Lichtverteilungen auf der Probe bei mehreren Wellenlängen, insbesondere durch

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einem dispersiven Element oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt.

57. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine parallele Aufnahme der Einzelbilder bei unterschiedlicher Phasenlage der Beleuchtung erfolgt.

58. Verfahren nach Anspruch 57 bei mehreren Wellenlängen, insbesondere mittels einer Anordnung mit einem dispersiven Element, und einer periodische Struktur die um die optische Achse verdrehbar ist, wobei das disperse Element vorzugsweise im Zwischenbild angeordnet ist und/oder einer

Anordnung mit einem dispersiven Element und einer periodische Struktur aus mehreren Teilen unterschiedlicher Periodizität und das dispersives Element vorzugsweise im Zwischenbild angeordnet ist und/oder

Anordnung mit einem dispersiven Element wobei die periodische Struktur reflektierend ausgebildet ist und als Strahlteiler wirkt.

59. Verfahren nach Anspruch 57 bei einer Wellenlänge, insbesondere mittels einer

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt wobei die Struktur um die optische Achse verdrehbar ist oder mittels

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt, wobei die Struktur aus mehreren Teilen zusammengesetzt ist.

60. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine parallele Aufnahme mit unterschiedlicher Modulationsfrequenz erfolgt.

61. Verfahren nach Anspruch 60 bei mehreren Wellenlängen, insbesondere mittels Anordnung eines dispersiven Element und einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert oder einer

Anordnung mit einem dispersiven Element, wobei die periodische Struktur aus Teilen unterschiedlicher Periodizität besteht, wobei das disperse Element vorzugsweise in einem Zwischenbild angeordnet ist.

62. Verfahren nach Anspruch 60 bei einer Wellenlänge, insbesondere mittels Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteiler AO aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur,

mit einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteiler AO aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, wobei die periodische Struktur aus Teilen unterschiedlicher Periodizität besteht.

63. Anordnung zur tiefe aufgelösten optischen Erfassung einer Probe, insbesondere des aufgrund von Wechselwirkung mit einer Probe beeinflussten Lichtes einer Beleuchtungslichtverteilung, insbesondere Fluoreszenzlichtes und/oder reflektierten Lichtes und/oder Lumineszenzlichtes und/oder gestreuten und/oder transmittierten Lichtes enthaltend

Mittel zur Beleuchtung der Probe mit mindestens einer Wellenlänge

Mittel zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen Probe und Beleuchtungslicht

Mittel zur Abbildung des von der Probe beeinflussten Lichtes auf mindestens einen Detektor

Mittel zur Abbildung einer zumindest eindimensional räumlich periodisch veränderlichen Struktur in unterschiedlichen Phasen und/oder Frequenzen der Periodizität auf die Probe

Mittel zur Berechnung mindestens eines optischen Schnittbildes aus der Ortsinformation des von der Probe beeinflussten Lichtes.

64. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Mittel zur bildlichen Darstellung des Schnittbildes vorgesehen sind.

65. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Mittel zur Abbildung mindestens eines Interferenzmusters vorgesehen sind.

66. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Beleuchtung durch mindestens

eine linienförmige Lichtverteilung erfolgt, die in der schmalen Richtung eine bis zu beugungsbegrenzte Ausdehnung und in der anderen, dazu rechtwinkligen Richtung ein Vielfaches dieser Ausdehnung aufweist.

67. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Abtastung mittels der Scanbewegung punktweise erfolgt.

68. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei innerhalb eines Scanfeldes eine Scanbewegung eines Linienmusters und/oder mindestens eines ein- oder zweidimensionalen Punktmusters erfolgt.

69. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein zusammengesetztes Bild aus den abgescannten Linien- und/oder Punktmustern erzeugt wird.

70. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein äquidistantes Raster von Linien- und/oder Punktmustern verwendet wird.

71. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Beleuchtungslicht mehrere Wellenlängen enthält.

72. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Scanvorgang mit einer Linie mit mehreren Wellenlängen erfolgt.

73. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Scanvorgang mit mehreren Linien gleichzeitig erfolgt.

74. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mit einer oder mehreren Wellenlängen gescannt wird.

75. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer periodische Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert.

76. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist.

77. Anordnung nach Anspruch 76, wobei die dispersive Aufspaltung in einer Zwischenbildebene erfolgt.

78. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Phasenkodierung bei simultaner Abbildung verschiedener Wellenlängen und 1 oder Linienfoki auf einen gemeinsamen Detektor erfolgt.

79. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei eine Frequenzkodierung bei simultaner Abbildung verschiedener Wellenlängen und/oder Linienfoki auf einen gemeinsamen Detektor erfolgt.

80. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei mehrere Wellenlängen zeitlich simultan auf die Probe abgebildet werden.

81. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei die Abbildung räumlich getrennt oder auf einen gemeinsamen Ort der Probe erfolgt.

82. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Wellenlänge auf die Probe abgebildet wird.

83. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei die Abbildung mehrfach räumlich getrennt oder auf einem Ort der Probe erfolgt.

84. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Lichtverteilung auf der Probe linien- oder punktförmig ausgebildet ist.

85. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei eine sequentielle Aufnahme der Einzelbilder erfolgt.

86. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei mehrere linien und/oder punktförmige Lichtverteilungen vorgesehen sind.

87. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei eine parallele Aufnahme der Einzelbilder erfolgt.

88. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche wobei die Detektion mit Punktdetektor und/oder Zeilendetektor und/oder Matrixdetektor erfolgt.

89. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur wellenlängenabhängigen Phasenkodierung.

90. Anordnung nach Anspruch 89 zur Erzeugung eines wellenlängenabhängigen Parallelversatzes entlang der periodischen Struktur.

91. Anordnung nach Anspruch 90, mit einer verkippten Planplatte in einem Zwischenbild.

92. Anordnung nach Anspruch 90 mit einem in Richtung der Periodizität dispersiven Element in einer Abbildungspupille.

93. Anordnung zur Phasenkodierung, mit einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist wobei die Struktur um die optische Achse verdrehbar ist.

94. Anordnung nach Anspruch 93, wobei die spektrale Aufspaltung in einem Zwischenbild erfolgt.

95. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen mit einer Optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist, mit einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert.

96. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen, wobei wellenlängenabhängig der Abbildungsmaßstab verändert wird.

97. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Frequenzkodierung mehrerer Wellenlängen mit einer optischen Anordnung mit einer dispersiven Einheit die das Beleuchtungslicht in spektrale Bestandteile aufspaltet

und wieder zusammenführt, die eine Abbildungsoptik zur Abbildung der spektralen Anteile in eine Brennebene aufweist, wobei in oder in der Nähe der Brennebene eine periodische Struktur zur wellenlängenabhängigen Beeinflussung des Beleuchtungslichtes vorgesehen ist, mit einer aus mehreren Teilen unterschiedlicher Periodizität zusammengesetzten Struktur.

98. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentiellen Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase unter Verschiebung der Struktur (PE) senkrecht zur optischen Achse. 5

99. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentielle Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase durch Lageverstellung eines Scanners.

100. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentiellen Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Bildphase durch Verkippung einer planparallelen Platte. 10

101. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentiellen Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Modulationsfrequenz mit Mitteln zur wellenlängenabhängigen Änderung des Abbildungsmaßstabes.

102. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentiellen Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Modulationsfrequenz durch Einschwenken verschiedener Gitter mit unterschiedlicher Periodizität.

103. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur sequentiellen Aufnahme der Einzelbilder bei geänderter Modulationsfrequenz durch Verschiebung einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert, senkrecht zur Periodizität. 15

104. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Erzeugung mehrerer Lichtverteilungen auf der Probe und parallelen Aufnahme der Einzelbilder.

105. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Erzeugung mehrerer Lichtverteilungen auf der Probe und paralleler Aufnahme der Einzelbilder bei einer Wellenlänge insbesondere unter Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel und/oder Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt. 20

106. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Erzeugung mehrere Lichtverteilungen auf der Probe und paralleler Aufnahme der Einzelbilder bei mehreren Wellenlängen, insbesondere unter 25

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einem dispersiven Element und/oder Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt. 30

107. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme der Einzelbilder bei unterschiedlicher Phasenlage der Beleuchtung.

108. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme der Einzelbilder bei unterschiedlicher Phasenlage der Beleuchtung bei mehreren Wellenlängen insbesondere mit einer 35

Anordnung mit einem dispersiven Element, wobei die periodische Struktur um die optische Achse verdrehbar ist und das

dispersives Element vorzugsweise in einem im Zwischenbild angeordnet ist und/ oder einer Anordnung mit einem dispersiven Element wobei die periodische Struktur aus mehreren Teilen unterschiedlicher Periodizität zusammengesetzt ist und/oder 40

Anordnung mit einem dispersiven Element wobei die periodische Struktur reflektierend ausgebildet ist und als Strahlteiler wirkt.

109. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme der Einzelbilder bei unterschiedlicher Phasenlage bei einer Wellenlänge insbesondere unter 45

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteileranordnung aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel und/oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, wobei die Struktur um die optische Achse verdrehbar ist und/oder 50

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteiler AO aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur,

wobei die Struktur aus mehreren Teilen zusammengesetzt ist. 55

110. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme mit unterschiedlicher Modulationsfrequenz.

111. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme mit unterschiedlicher Modulationsfrequenz bei mehreren Wellenlängen, insbesondere mit einer

Anordnung mit einem dispersiven Element und einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur Richtung der Periodizität (X) ändert und/oder 60

Anordnung mit einem dispersiven Element und einer periodischen Struktur, wobei die periodische Struktur aus Teilen unterschiedlicher Periodizität besteht,

wobei das dispersive Element vorzugsweise im Zwischenbild angeordnet ist.

112. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur parallelen Aufnahme mit unterschiedlicher Modulationsfrequenz bei einer Wellenlänge insbesondere unter 65

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteiler AO aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel und/oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt und/oder mit einer periodischen Struktur, deren Periode sich mindestens in einer Raumrichtung (Y) im wesentlichen senkrecht zur

Richtung der Periodizität (X) ändert und/oder

5 Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit einer Strahlteiler AO aus mindestens einem Vollspiegel und einem teildurchlässigen Spiegel oder

Aufspaltung der Beleuchtung in mehrere Teilstrahlen mit mindestens einem Spiegel und einer reflektierenden periodischen Struktur, die als Strahlteiler wirkt wobei die periodische Struktur aus Teilen unterschiedlicher Periodizität besteht.

10 113. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei vor der Detektoranordnung mindestens ein dispergierendes Element vorgesehen ist.

114. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche in einem Mikroskop, vorzugsweise einem Laser-Scanning-Mikroskop.

Hierzu 19 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

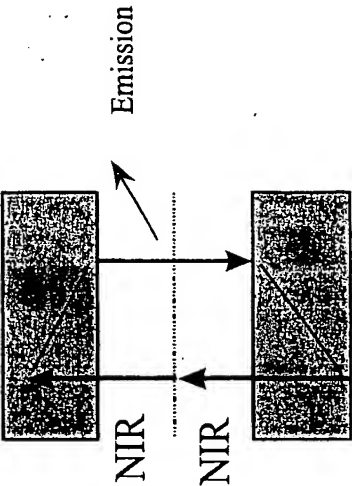
55

60

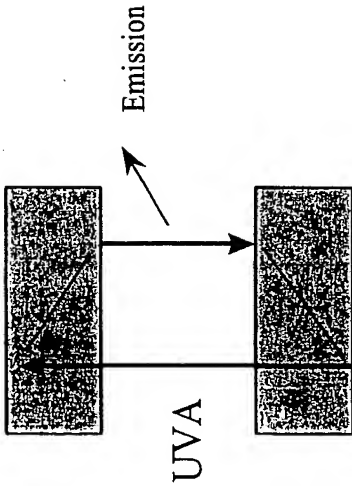
65

- Leerseite -

Abb.: 1



b.)



a.)

LSM / Linienscanner -Stand der Technik

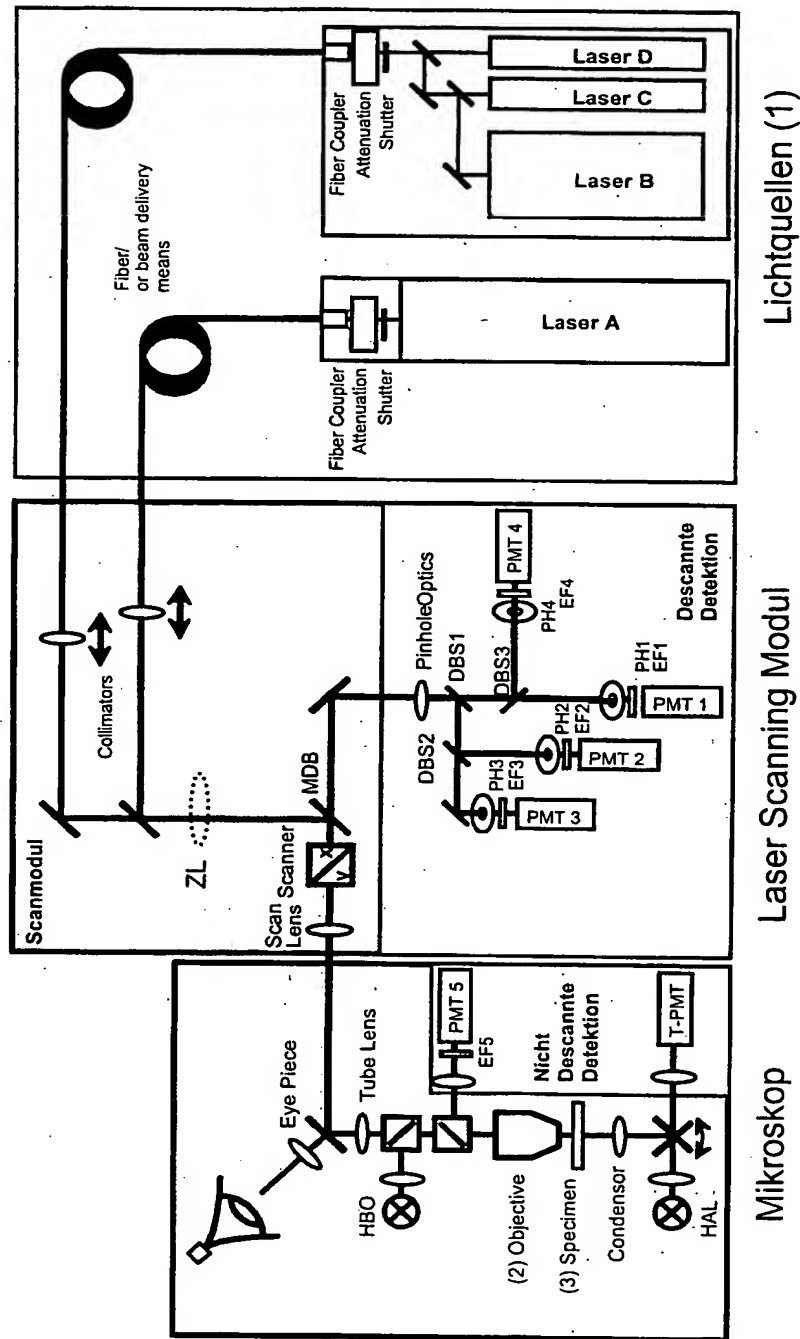


Abb.: 2

Strukturierte Beleuchtung - Stand der Technik

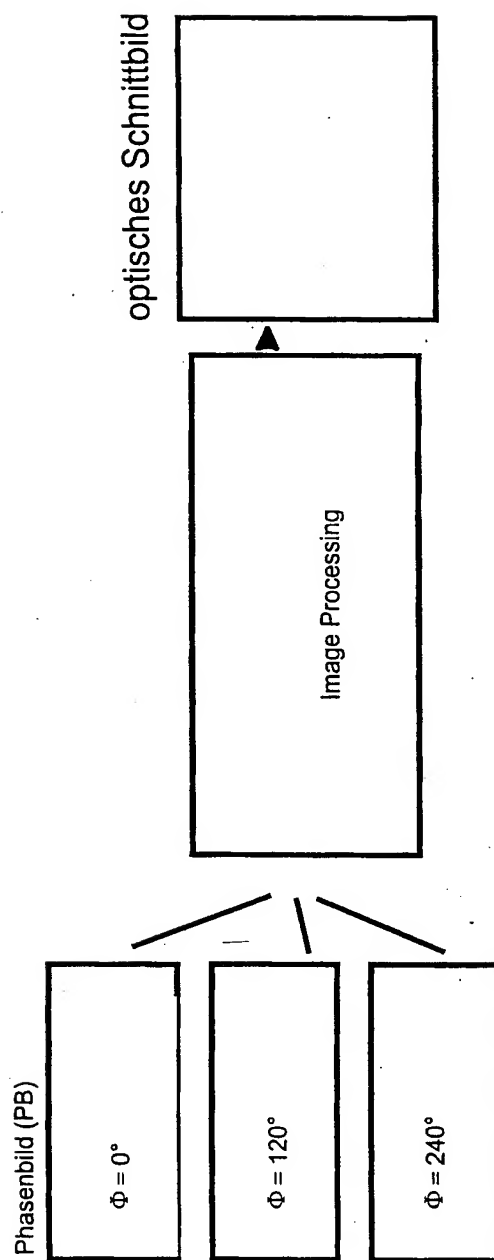


Abb.: 3

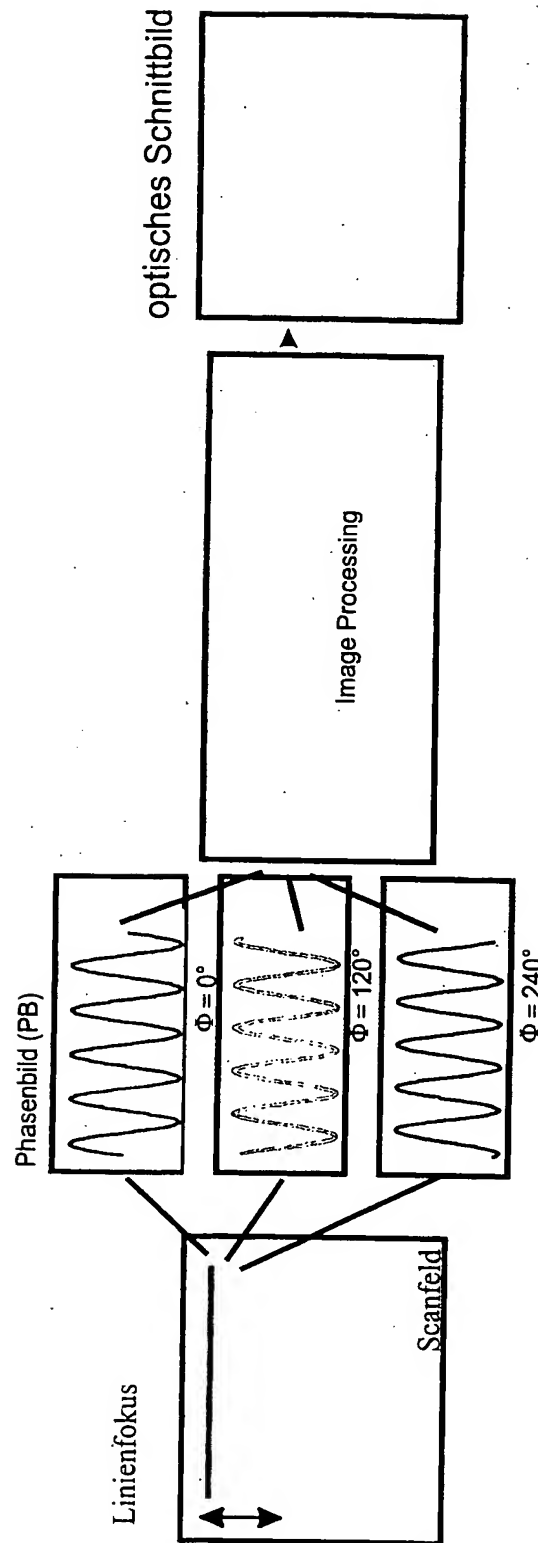
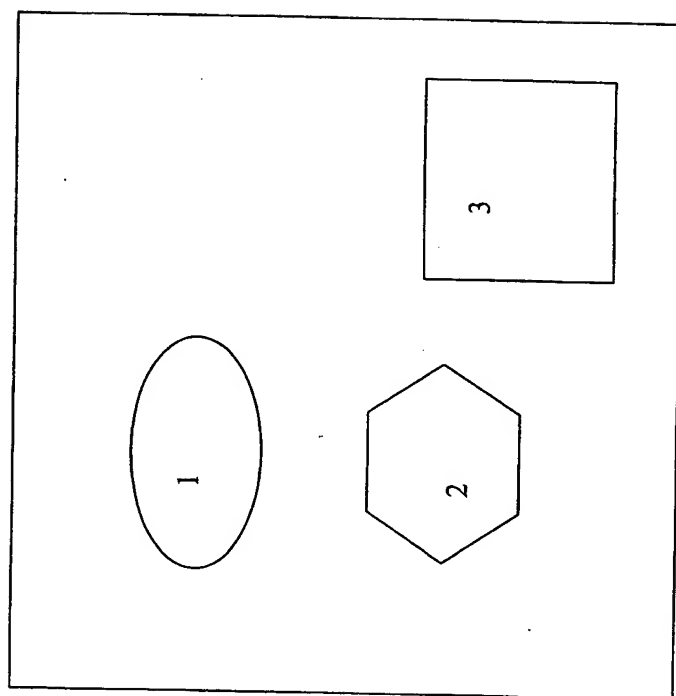


Abb.: 4



Scanfeld

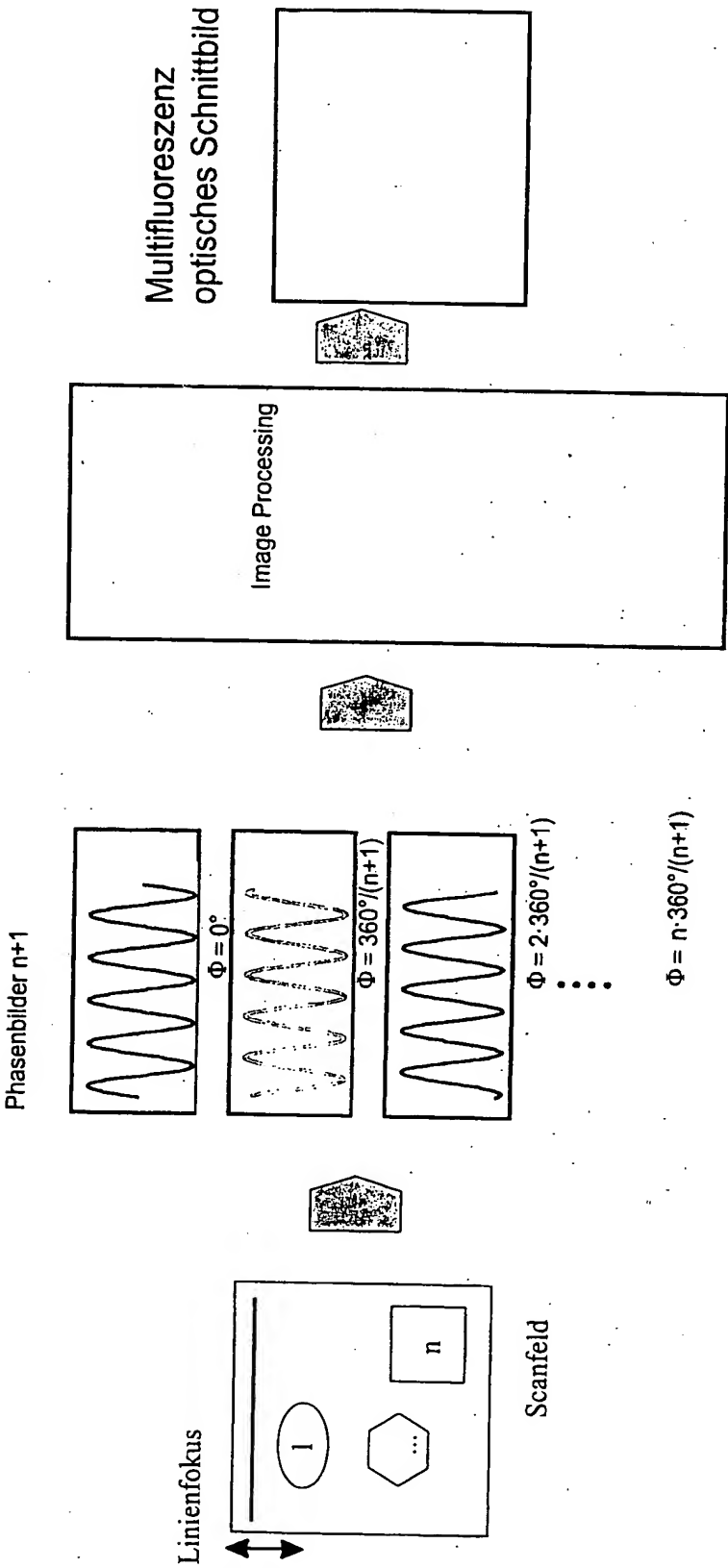


Abb.: 6

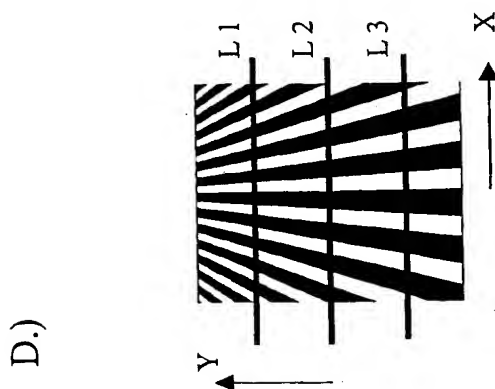
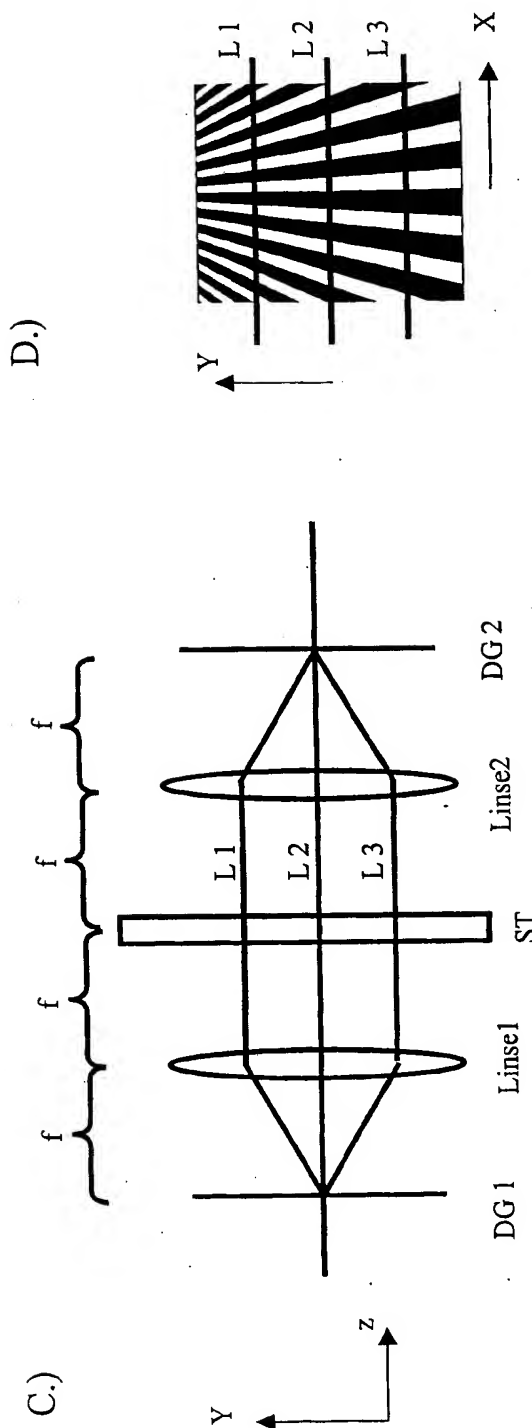
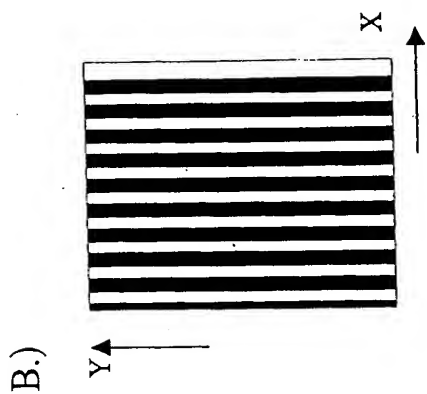
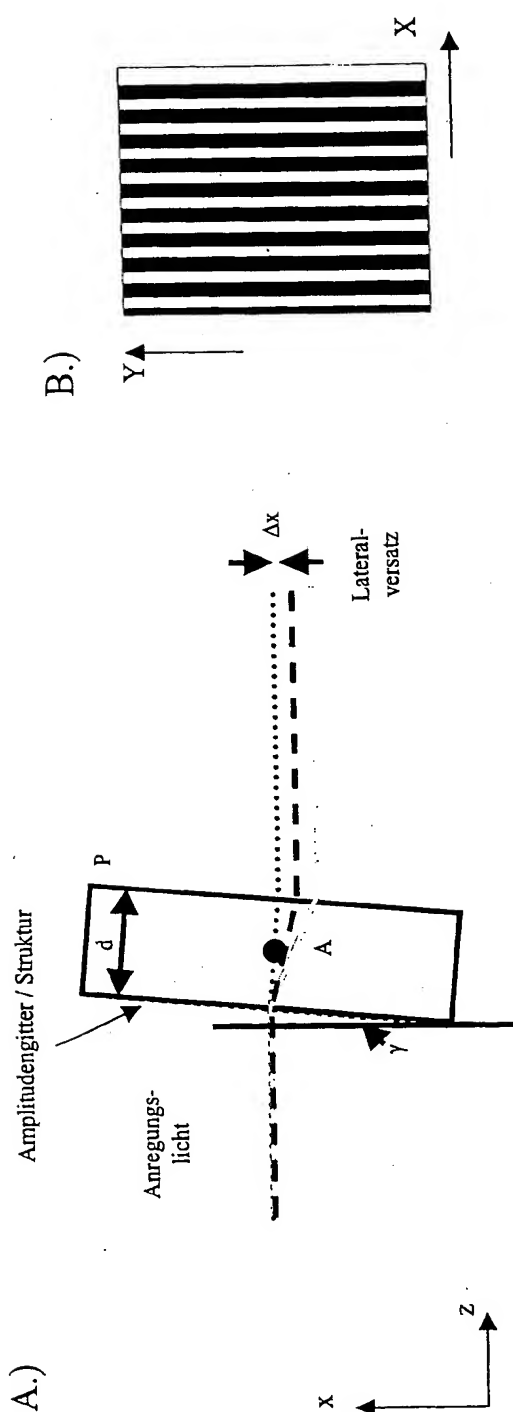


Abb.: 7

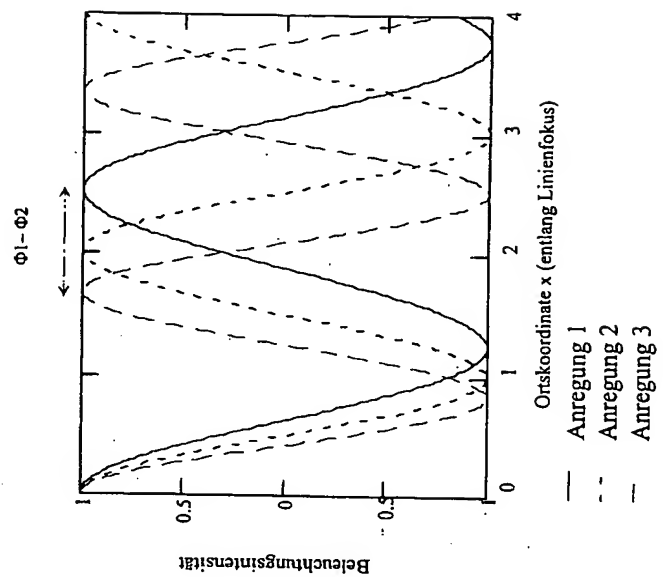


Abb.: 8

Scanlinie

Scanfeld

X

Y

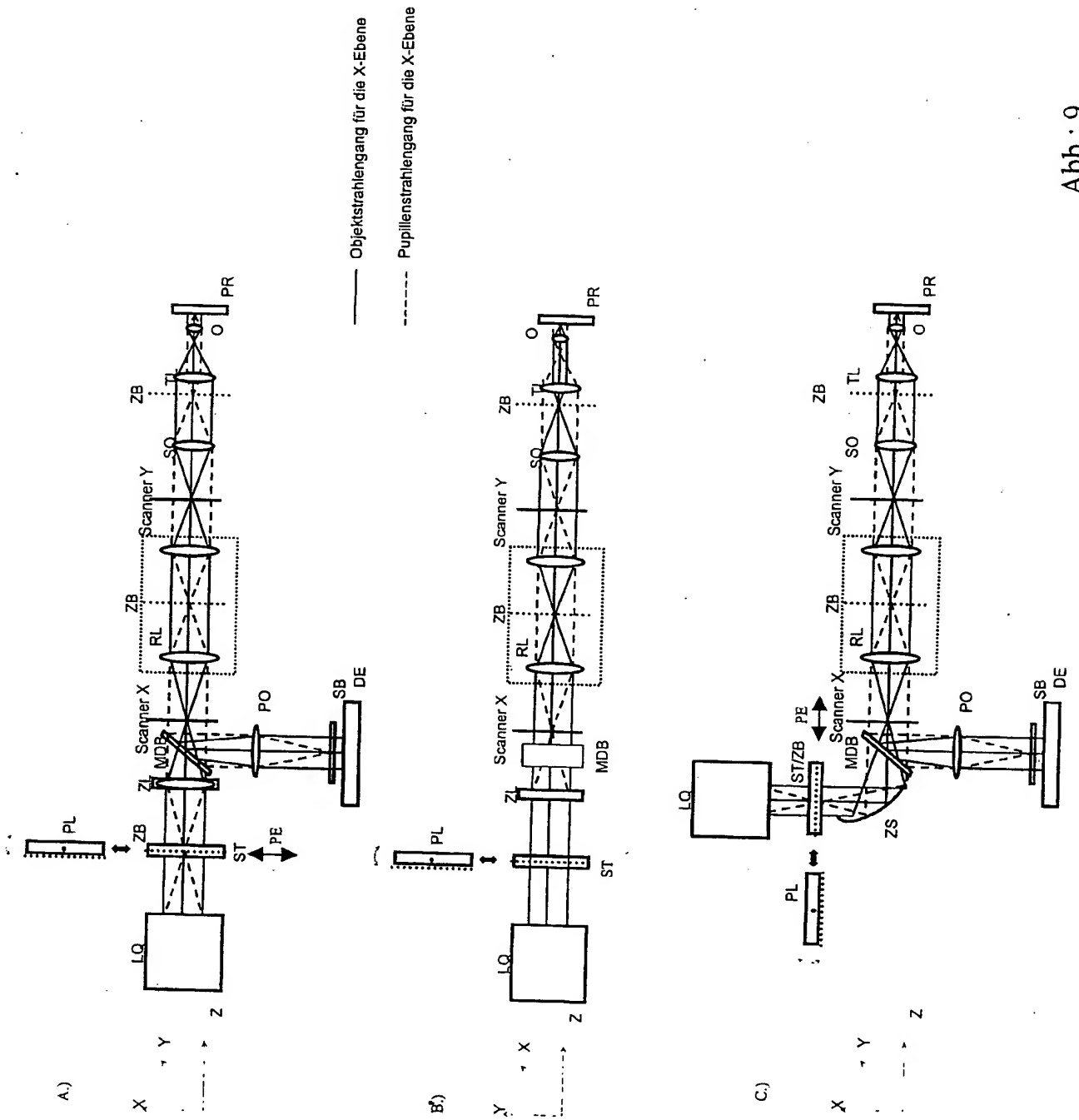
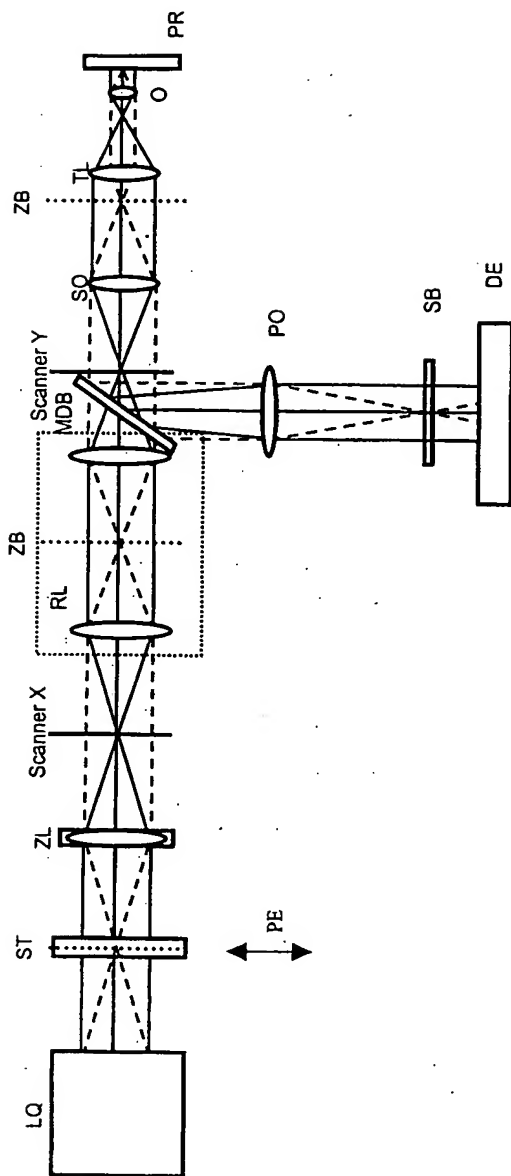
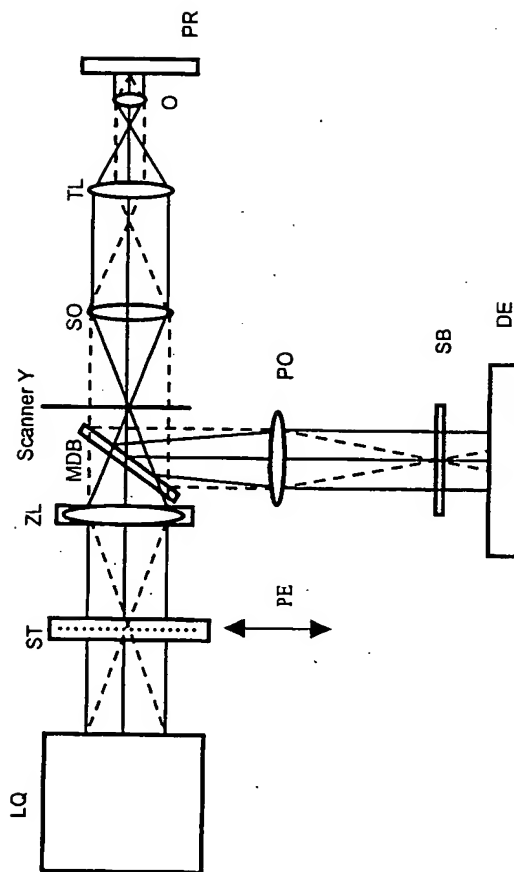


Abb.: 9



A.)



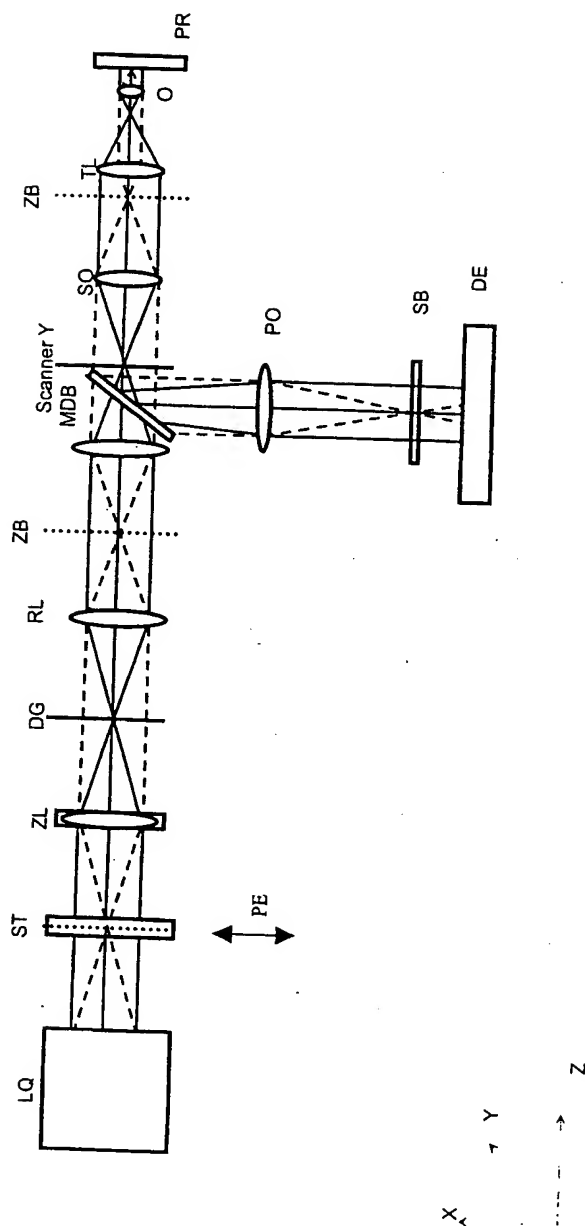
B.)

— Objektstrahlengang für die X-Ebene
 - - - Pupillenstrahlengang für die X-Ebene

X
 Y
 Z

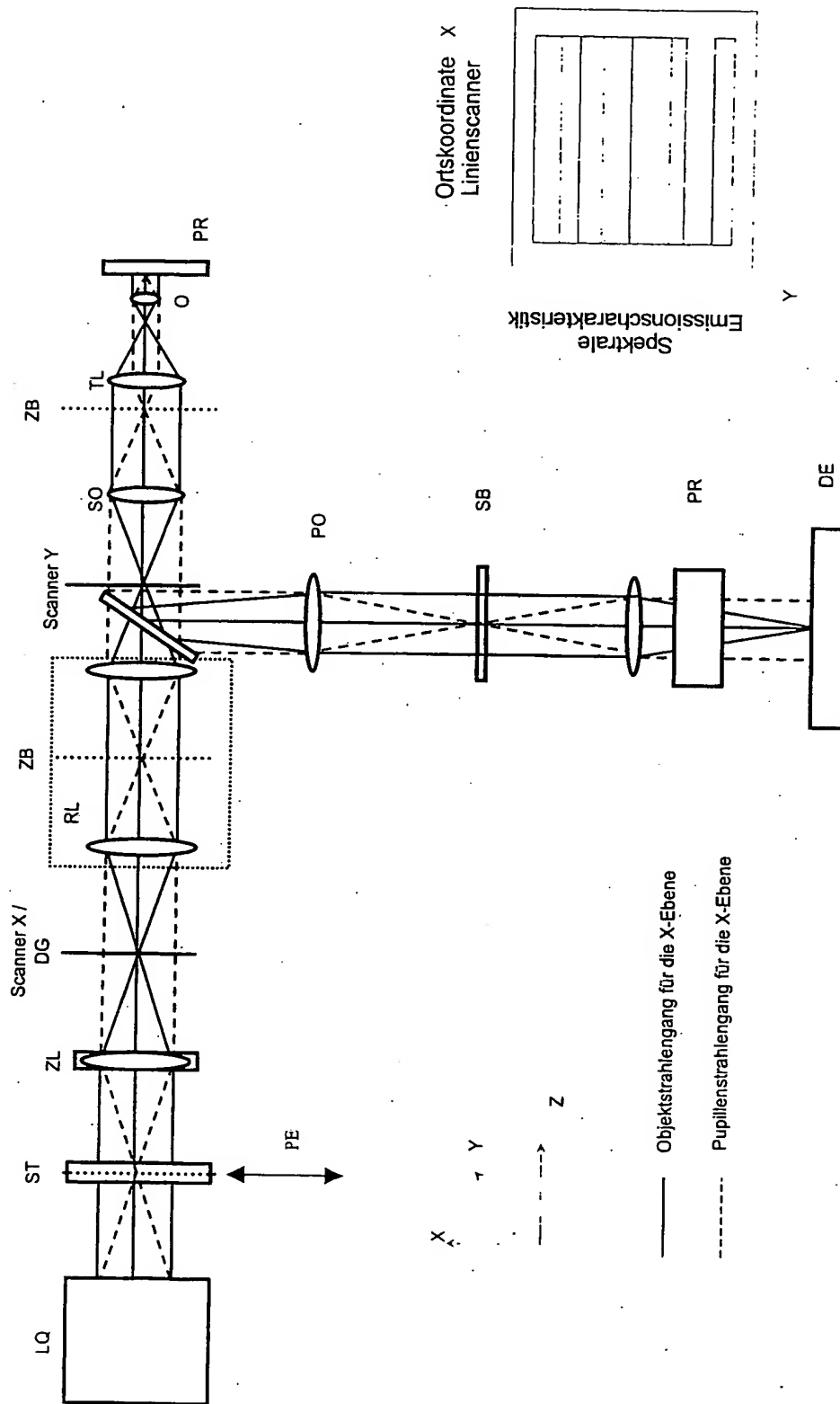
Abb.: 10

Abb.: 11



— Objektstrahlengang für die X-Ebene
- - - Pupillenstrahlengang für die X-Ebene

Abb.: 12



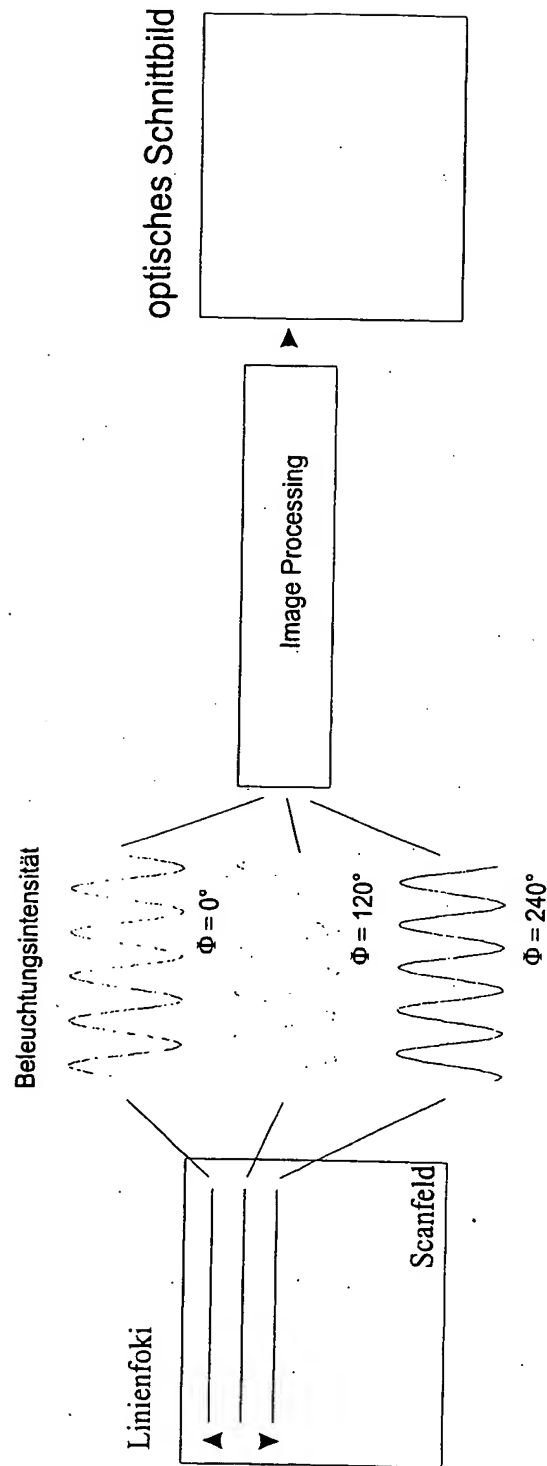
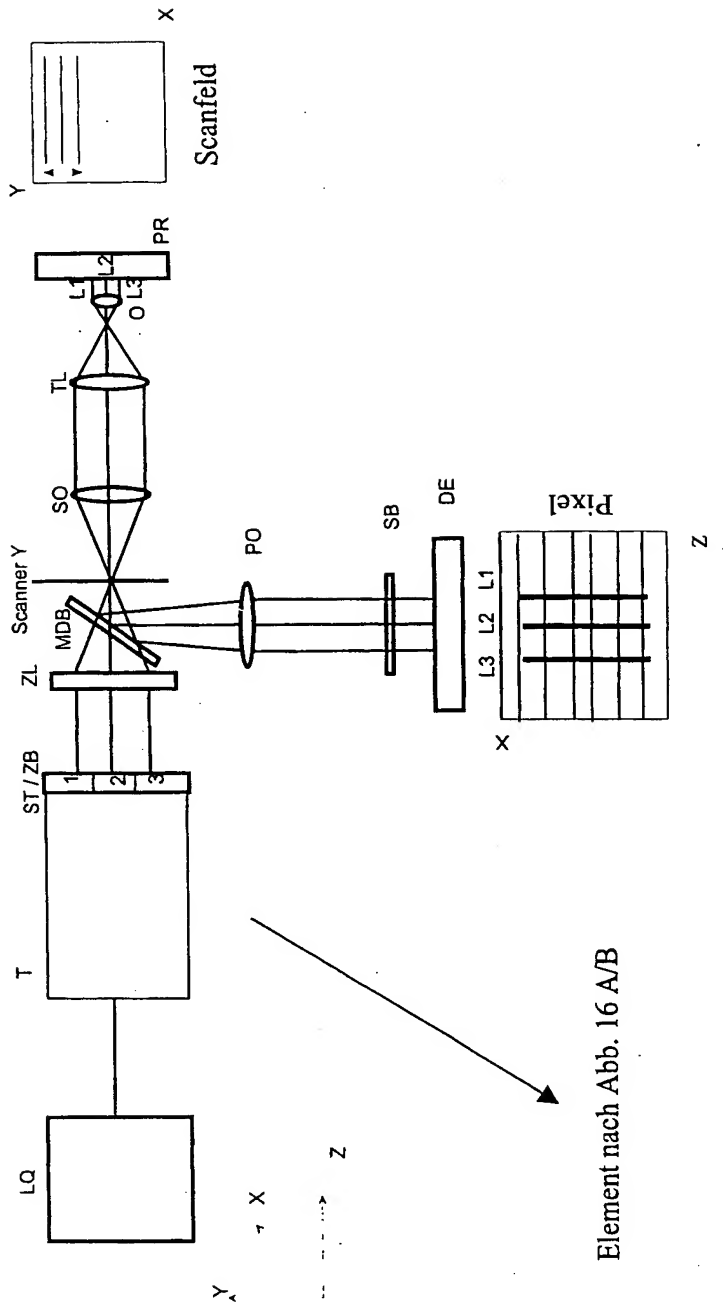


Abb.: 14

Abb.: 15



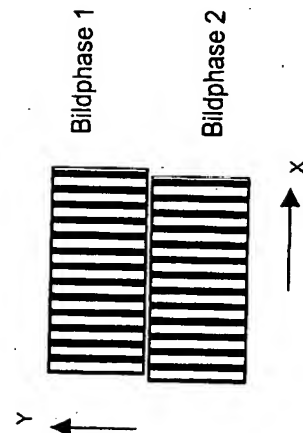
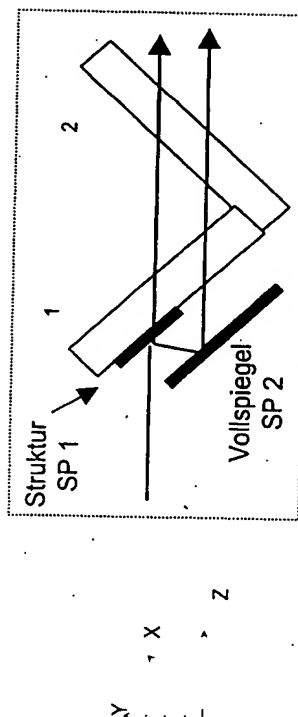
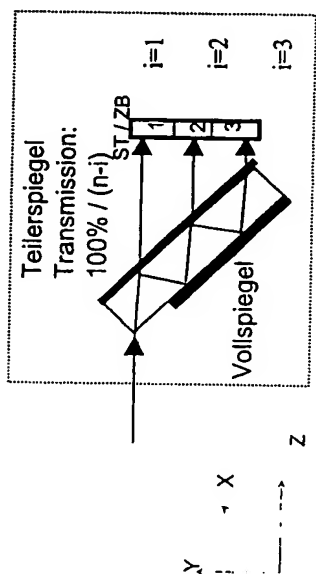
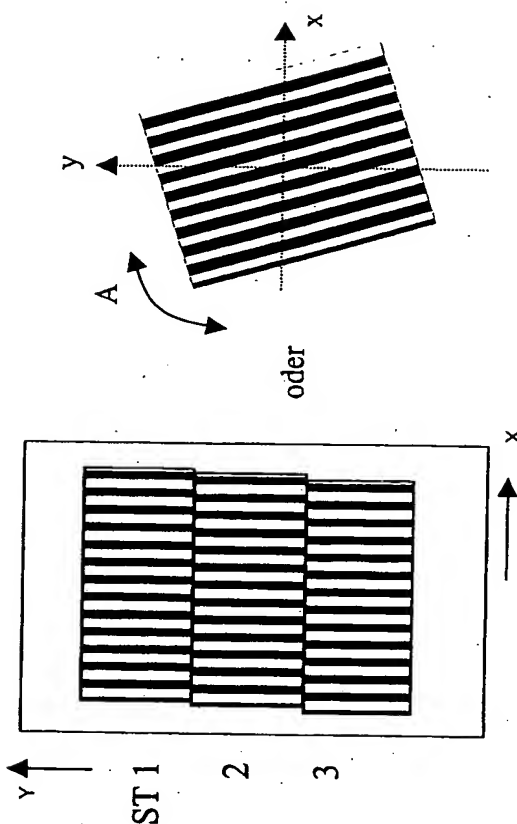
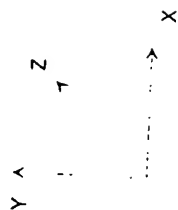
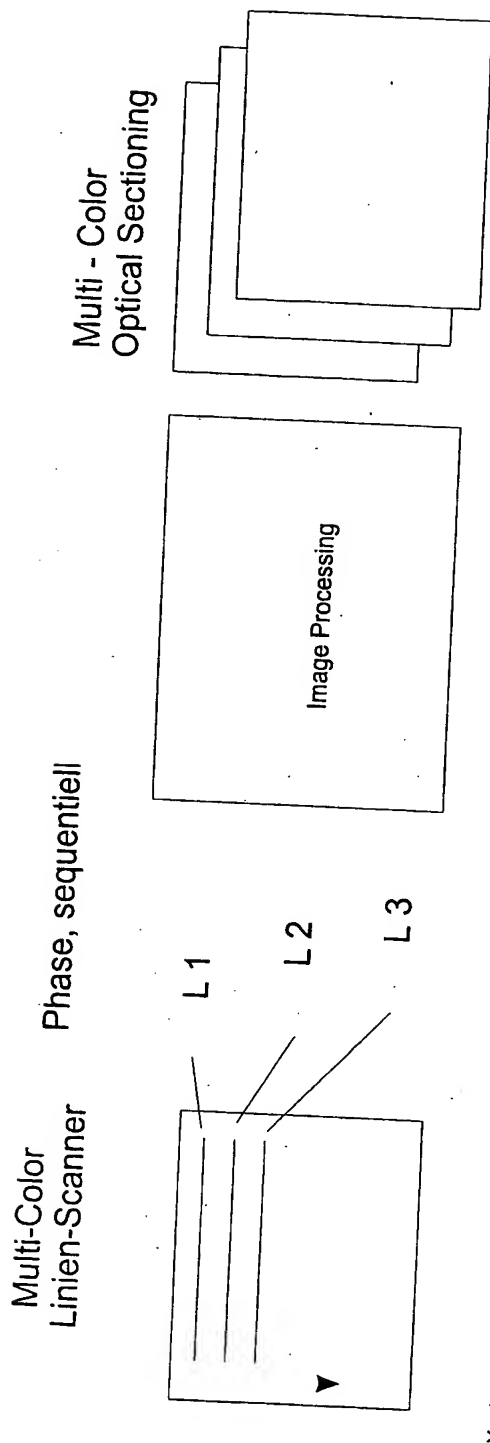


Abb.: 16



Ortskoordinate
Linien-scanner

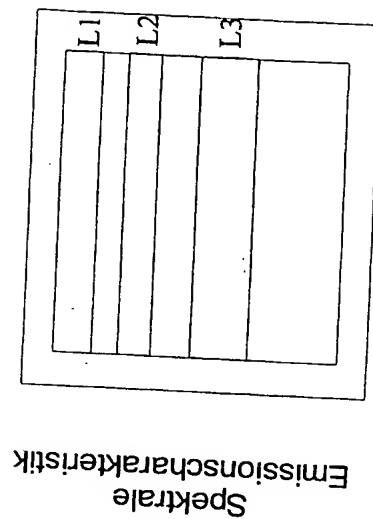
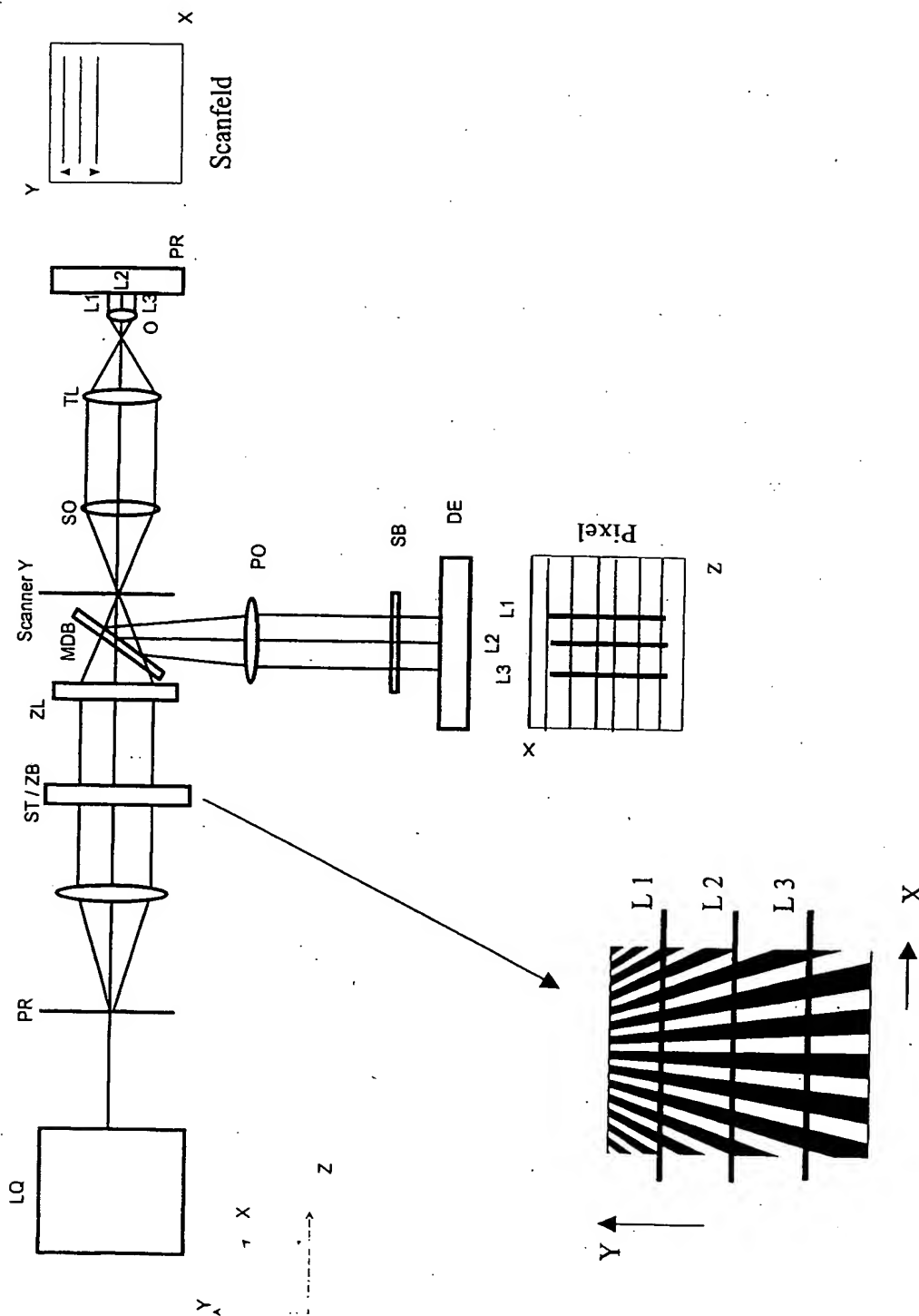


Abb.: 17

Abb.: 18



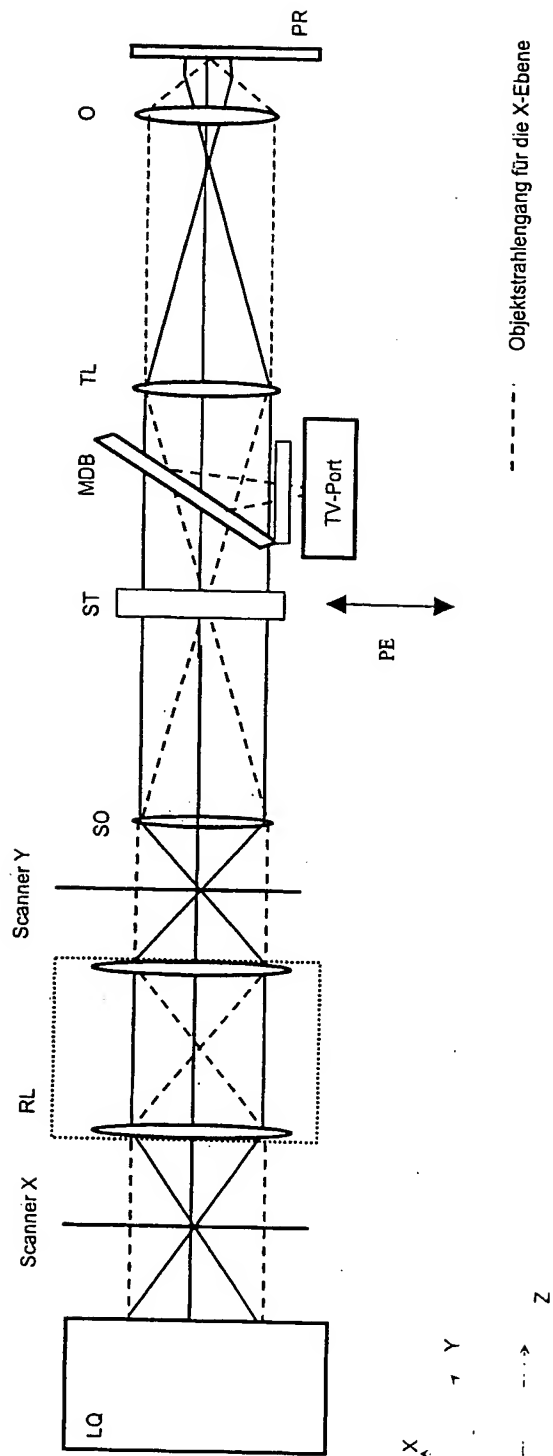
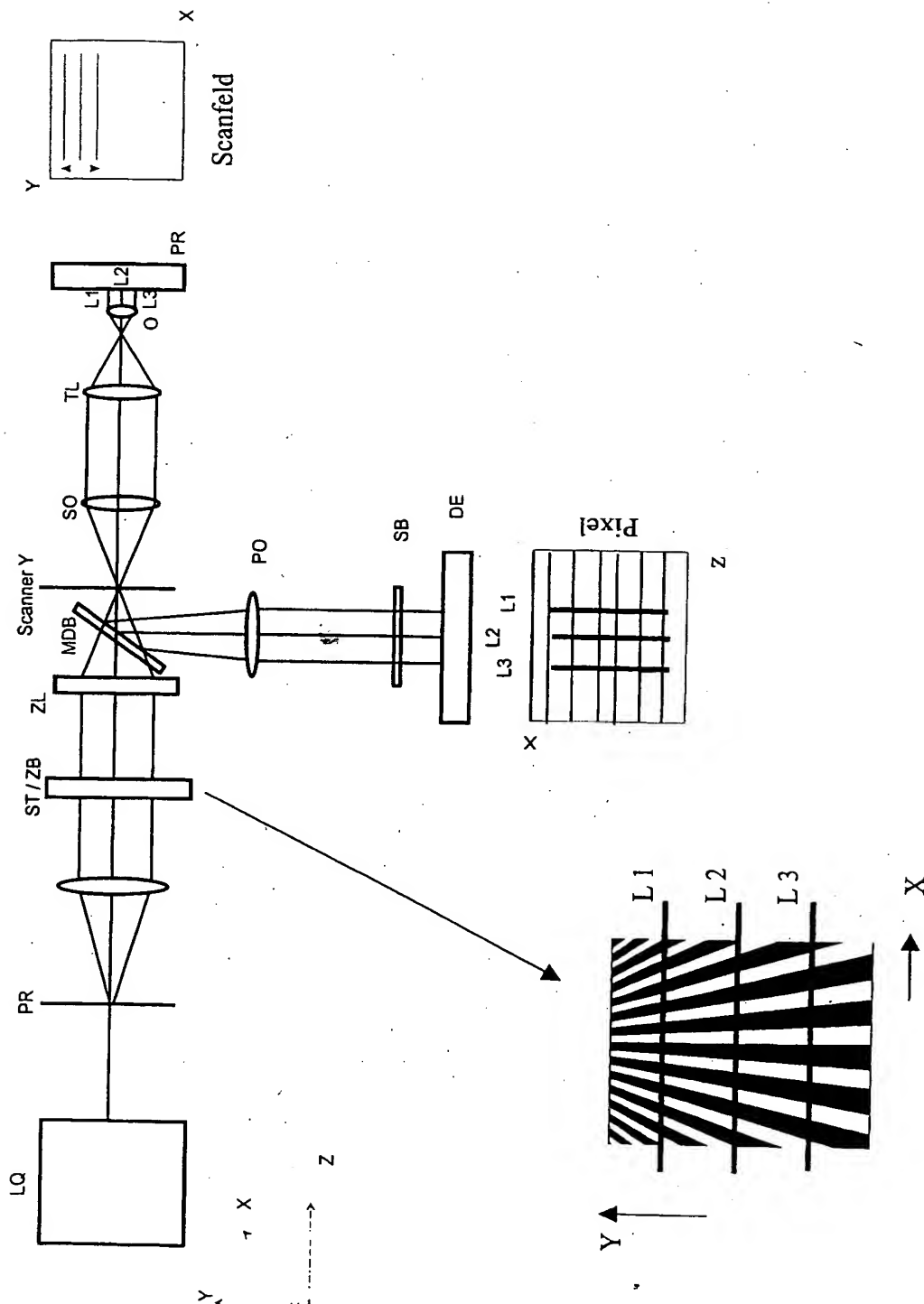


Abb.: 19

Abb.: 18



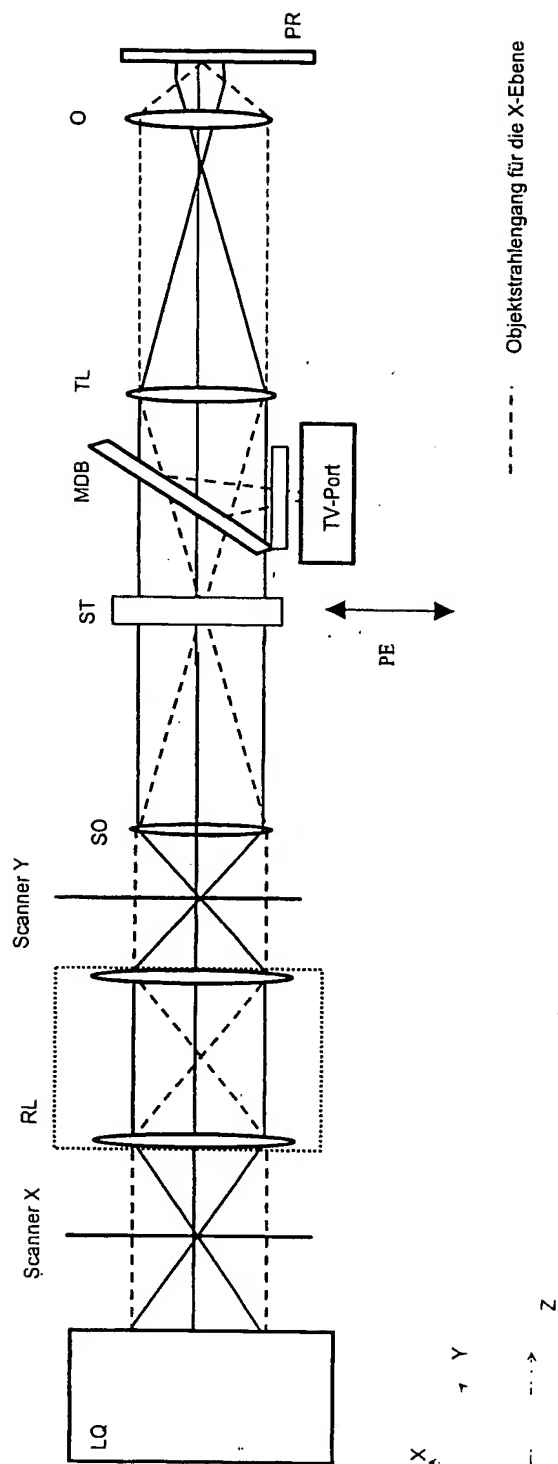


Abb.: 19

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)